

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



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Το αίσθημα του πόνου στα εκτρεφόμενα ψάρια»

Δημήτριος Μανουσάκης

ΒΟΛΟΣ 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Παναγιωτάκη Παναγιώτα**, Υδατοκαλλιέργειες, Καθηγήτρια ΠΘ, **Επιβλέπουσα**
- 2) Γκολομάζου Ελένη**, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Επ. Καθηγήτρια ΠΘ, **Μέλος**
- 3) Μαλανδράκης Εμμανουήλ**, Εκτροφή Υδρόβιων Οργανισμών, Επ. Καθηγητής ΓΠΑ, **Μέλος**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα. Παναγιωτάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Γκολομάζου Ελένη και Μαλανδράκη Εμμανουήλ. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την ανοχή, την υπομονή και την ανιδιοτελή προσφορά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή.....	8
1. Γενικοί ορισμοί και έννοιες.....	9
1.1 Πόνος.....	9
1.2 Μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων & Υποδοχείς πόνου.....	11
1.3 Καταπόνηση.....	12
1.4 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ).....	13
1.5 Οπιοειδή.....	14
1.5.1 Ταξινόμηση οπιοειδών.....	14
1.6 Συνείδηση.....	15
1.7 Ευζωία των ψαριών.....	16
2. Απόδειξη αντίληψης του πόνου στα ψάρια.....	17
2.1 Η συμμετοχή του εγκεφάλου.....	17
2.1.1 Διαφορές στη συμπεριφορά και στη φυσιολογία.....	19
2.1.2 Παρατηρήσιμες ενδείξεις πόνου.....	21
2.2 Έρευνα για τον πόνο των ψαριών.....	22
2.3 Κριτήρια για την μετάδοση επώδυνων νευρικών ερεθισμάτων και τον πόνο	27
2.3.1 Υποδοχείς επώδυνων ερεθισμάτων.....	28
2.3.2 Εγκεφαλικές δομές.....	29
2.3.3 Μονοπάτια προς ανώτερες δομές του εγκεφάλου.....	30
2.3.4 Υποδοχείς οπιοειδών και ουσίες.....	33

2.3.5 Μειωμένη απόκριση σε επώδυνα ερεθίσματα λόγω αναλγητικών.....	34
2.3.6 Εκμάθηση αποφυγής.....	35
2.3.7 Αναστολή φυσιολογικής συμπεριφοράς.....	35
2.4 Νευροανατομικά στοιχεία της αντίληψης πόνου.....	37
2.4.1 Επισκόπηση του εγκεφάλου των τελεόστεων.....	37
2.4.2 Νευροανατομικοί συσχετισμοί.....	40
2.4.3 Στοιχεία νευροφυσιολογίας.....	42
2.4.4 Γνωστική λειτουργία των ψαριών.....	45
2.4.5 Διένεξη για τον πόνο των ψαριών.....	48
3. Μελέτες σε είδη ιχθύων.....	50
3.1 Πείραμα με την ιριδίζουσα πέστροφα (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	50
3.2 Πείραμα με το ψάρι ζέβρα (<i>Danio rerio</i>)	55
3.2.1 1 ^η μελέτη-Συμπεριφορικό μοντέλο του ψαριού ζέβρα.....	56
3.2.2 2 ^η μελέτη-Επίδραση της μορφίνης στην απόκριση.....	57
3.2.3 3 ^η μελέτη- Τροποποίηση της επίδρασης της μορφίνης με ναλοξόνη.....	57
3.3 Αποτελέσματα.....	57
Συμπεράσματα.....	60
Βιβλιογραφία	

Περίληψη

Η ευζωία των ψαριών είναι ένα μείζον ζήτημα το οποίο έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων, καθώς αποτελούν τη πολυπληθέστερη ομάδα των σπονδυλωτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως το σύστημα αντίχνευσης επώδυνων ερεθισμάτων των ψαριών έχει αρκετές ομοιότητες με αυτό των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αν λάβουμε υπόψιν μας την εξελικτική πορεία αυτών των ειδών και το περιβάλλον στο οποίο καλούνται να επιβιώσουν, τότε καταλαβαίνουμε ότι είναι πολύ σημαντικό να αξιολογήσουμε τον πόνο και τις φυσιολογικές τους συμπεριφορές. Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί κριτήρια τα οποία πρέπει να τηρούνται ώστε να μπορούμε να πούμε με σιγουριά πως τα ψάρια είναι αισθανόμενα όντα, ρυθμίζοντας τις συμπεριφορές τους ανάλογα με το ερέθισμα το οποίο υφίστανται. Εφόσον αποδειχθεί αυτό, θα πρέπει να εξετάσουμε καλύτερα τις νομοθεσίες για την ευζωία των ψαριών, καθώς οι άνθρωποι ως αισθανόμενα όντα έχουμε την ηθική υποχρέωση να το πράξουμε.

Abstract

Fish welfare is a major issue that has piqued the interest of many scientists, as they are the most populous group of vertebrates. Interestingly, the system for detecting painful stimuli in fish has several similarities to that of mammals, including humans. If we take into account the evolutionary process of these species and the environment in which they are called to survive, then we understand that it is very important to evaluate pain and their normal behaviors. For this reason, criteria have been proposed that must be met so that we can say with confidence that fish are sentient beings, regulating their behaviors according to the stimulus they have received. If this is to be proven, we need to look better at fish welfare legislation, as humans as sentiments have a moral obligation to do so.

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα ψάρια διαθέτουν εξειδικευμένους υποδοχείς οι οποίοι ανιχνεύουν επώδυνα ερεθίσματα και είναι παρόντες σε ανώτερα χερσαία σπονδυλωτά. Υπάρχουν πλέον ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές επιβλαβούς διέγερσης αυτών των υποδοχέων, η οποία προκαλεί αλλαγές στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά των οργανισμών. Για να προσδιορίσουμε το αν αυτές οι καταστάσεις που αντιμετωπίζουν τα ψάρια είναι πόνος ή μια απλή αντίδραση σε ένα ερέθισμα θα πρέπει να εξετάσουμε ανώτερες πτυχές όπως ο εγκέφαλος και το κεντρικό νευρικό σύστημα αυτών των ειδών. Η κρίση για το εάν τα ψάρια είναι ικανά να βιώσουν πόνο είναι καθαρά υποκειμενική από τη μεριά του ανθρώπου και γι αυτό επικρατούν συχνά διενέξεις. Η παρούσα εργασία αναφέρεται στις διενέξεις αυτές, καθώς επίσης και σε στοιχεία, μελέτες και αποδείξεις οι οποίες αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για τον πόνο των ψαριών.

1. Γενικοί Ορισμοί και Έννοιες

1.1 Πόνος

Ο πόνος είναι μια έννοια περίπλοκη και δεν υπάρχει ακόμη εντελώς αποδεκτός ορισμός που να ταιριάζει σε όλες τις πιθανές καταστάσεις, ειδικά όταν πρόκειται για διαφορετικά είδη ζώων. Ο ορισμός από τη Διεθνή Ένωση για τη Μελέτη του Πόνου (IASP) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος. Έχει επεξεργαστεί λαμβάνοντας υπόψιν τον άνθρωπο και δηλώνει ότι ο πόνος είναι «μια δυσάρεστη αισθητηριακή και συναισθηματική εμπειρία που σχετίζεται με πραγματική ή πιθανή βλάβη των ιστών ή περιγράφεται με όρους τέτοιας βλάβης». Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, ο πόνος περιλαμβάνει αισθητήριες και αρνητικές συναισθηματικές πτυχές και είναι μια συνειδητή εμπειρία (δηλαδή, το άτομο γνωρίζει ότι βρίσκεται σε πόνο). Η αντίληψη των ζώων στα ερεθίσματα που προκαλούν πόνο στον άνθρωπο, όπως σημαντική μηχανική πίεση, ακραίες θερμοκρασίες και επιβλαβή χημικά (π.χ. οξέα, δηλητήρια), είναι εύκολα αποδεδειγμένες. Αλλά η μέτρηση του αρνητικού συναισθηματικού συστατικού, που μπορεί να περιγραφεί ως δυσφορία ή πόνος, είναι προβληματική, αλλά δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε πώς «αισθάνεται ένα ζώο». Ο ορισμός αυτός του IASP επεκτείνεται από μια σειρά σημειώσεων που επισημαίνουν την πιθανότητα τα ζώα να βιώσουν πόνο ακόμα κι αν δεν μπορούμε να αξιολογήσουμε την παρουσία του. Επιπλέον, σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, η εμπειρία του πόνου θα ήταν διαφορετική από αυτή στον άνθρωπο, καθώς ο πόνος είναι ένα υποκειμενικό γεγονός. Τέλος, παρουσιάζει την ιδέα ότι τα ζώα μπορεί να βιώσουν την ανταπόκριση σε βλαβερά ερεθίσματα μόνο σε αντίθεση με τον πόνο επειδή μπορεί να μην βιώνουν μια ψυχολογική κατάσταση παρόμοια με αυτή του ανθρώπου, ιδέα η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διενέξεις για τον πόνο. Η μη λεκτική επικοινωνία καθώς και τα πιθανά συναισθήματα και η ψυχολογία των ζώων βρίσκονται στο επίκεντρο αυτών των πρόσθετων σημειώσεων. Το Αμερικανικό Κολέγιο Κτηνιατρικής Αναισθησίας και Αναλγησίας (ACVAA, 2017) πρότεινε έναν ορισμό του πόνου που αντικατοπτρίζει αυτά τα προβλήματα: «ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει παθοφυσιολογικά και ψυχολογικά συστατικά που συχνά είναι δύσκολο να αναγνωριστούν και να ερμηνευθούν σε ζώα». Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δεν αναγνωρίζεται συνήθως στη διένεξη σχετικά με τα ψάρια.

Περαιτέρω, ο πόνος μπορεί να οριστεί σε σχέση με τη διάρκεια και την αιτία του. Μπορεί να έχει πολλές κλινικές επιπτώσεις σε ζώα, οι οποίες μπορούν να εκτιμηθούν κυρίως μέσω της παρακολούθησης των φυσιολογικών και των συμπεριφορικών παραμέτρων. Μια σημαντική δυσκολία για την εκτίμηση της καλής διαβίωσης στα ψάρια είναι ότι οι περισσότεροι από τους συνήθως χρησιμοποιούμενους δείκτες πόνου (Anil & Deen, 2002) είναι πολύ δύσκολοι ή απλά ακατάλληλοι να εκτιμηθούν στα ψάρια.

Οι επιστήμονες μπορούν να αξιολογήσουν την πιθανότητα πόνου στα ζώα μέσω έμμεσων μεθόδων (Molony, 1997, Zimmerman, 1986), όπως ανεπιθύμητες αλλαγές στη συμπεριφορά και τη φυσιολογία ως απόκριση σε ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν και τη μείωση ή εξάλειψη αυτών των συμπεριφορών με τη χορήγηση αναλγησίας. Οι ορισμοί του πόνου στα ζώα βασίζονται έτσι σε αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί και να μετρηθεί, παρά σε υποκειμενικές καταστάσεις.

Είναι ζωτικής σημασίας ο ορισμός του πόνου με βάση τα ζώα να επιτρέπει αυστηρή επιστημονική διερεύνηση διαφορετικών ειδών και επίσης να μας επιτρέπει να εντοπίζουμε, να αξιολογούμε και να ανακουφίζουμε τον πόνο στα ζώα, όπου αυτό είναι δυνατόν. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ορισμός για τα ζώα, είναι «μια αποτρεπτική αισθητηριακή εμπειρία που προκαλείται από πραγματικό ή δυνητικό τραυματισμό που προκαλεί προστατευτικές και φυσικές αντιδράσεις, οδηγεί σε μαθησιακή συμπεριφορά και μπορεί να τροποποιήσει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά» (Zimmerman, 1986). Η Sneddon (2009) βελτίωσε αυτόν τον ορισμό, υποδηλώνοντας ότι τα ζώα θα πρέπει “γρήγορα να μάθουν να αποφεύγουν τα επιβλαβή ερεθίσματα και να επιδεικνύουν παρατεταμένες αλλαγές στη συμπεριφορά που έχουν προστατευτική λειτουργία για να μειώσουν τον περαιτέρω τραυματισμό και τον πόνο, να αποτρέψουν την επανεμφάνιση του τραυματισμού και να προωθήσουν τη θεραπεία και την ανάρρωση.” Αυτοί οι ορισμοί χρησιμοποιούνται ως βάση για τα κριτήριά μας βάσει των οποίων μπορεί να κριθεί η πιθανή εμπειρία πόνου.

1.2 Μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων & Υποδοχείς πόνου

Ο όρος “Nociception” ορίζεται από τη Διεθνή Ένωση για τη Μελέτη του Πόνου (IASP) ως «οι νευρικές διεργασίες κωδικοποίησης επιβλαβών ερεθισμάτων», όπου ένα επιβλαβές ερέθισμα είναι «ένα πραγματικό ή πιθανό συμβάν βλάβης ιστού που μετατρέπεται και κωδικοποιείται από υποδοχείς επιβλαβών ερεθισμάτων». Κατά τη διαδικασία κωδικοποίησης επιβλαβών ερεθισμάτων, η έντονη χημική ουσία (π.χ. σκόνη καγιέν), η μηχανική (π.χ. κοπή, σύνθλιψη) ή η θερμική (θερμότητα και κρύο) διέγερση των αισθητήριων νευρικών κυττάρων που ονομάζονται “nociceptors” παράγει ένα σήμα που ταξιδεύει κατά μήκος μιας αλυσίδας νευρικών ινών μέσω του νωτιαίου μυελού στον εγκέφαλο. Η διαδικασία κωδικοποίησης επιβλαβών ερεθισμάτων προκαλεί εύρος φυσιολογικών και συμπεριφορικών αποκρίσεων και συνήθως οδηγεί σε μια υποκειμενική εμπειρία ή αντίληψη του πόνου στα αισθανόμενα όντα.

Ως “nociceptor” (“υποδοχέας πόνου”) ορίζεται ένας αισθητηριακός νευρώνας που ανταποκρίνεται σε βλαβερά ή δυνητικά βλαβερά ερεθίσματα στέλνοντας σήματα «πιθανής απειλής» στον νωτιαίο μυελό και στον εγκέφαλο. Εάν ο εγκέφαλος αντιληφθεί την απειλή ως αξιόπιστη, δημιουργεί την αίσθηση του πόνου για να κατευθύνει την προσοχή στο μέρος του σώματος, έτσι ώστε η απειλή να μπορεί να μετριαστεί. Έχει αποδειχθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι παρόντες σε θηλαστικά (Le Bars, Gozariu & Cadden, 2001), πουλιά (Gentle, 1989), ερπετά (Liang & Terashima, 1993), αμφίβια (Stevens, 2011), ψάρια (αλλά όχι σε ελασμοβράγχια) (Sneddon, Braithwaite & Gentle, 2003) και ασπόνδυλα (Tracey, 2017). Η παρουσία τους είναι λογική επειδή η ικανότητα ανίχνευσης πιθανών βλαβών ισοδυναμεί με την επιβίωση.

Οι “Nociceptors” είναι ελεύθερα νευρικά άκρα που κατά προτίμηση ανιχνεύουν βλαβερά ερεθίσματα που προκαλούν βλάβη στους ιστούς. Στα σπονδυλωτά απαντώνται συνήθως με δύο τύπους ινών: 1) μικρές μυελινωμένες ίνες A-δέλτα και 2) μικρότερες μη μυελινωμένες ίνες C (Lynn, 1994). Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να βρεθούν τόσο στην περιφέρεια (Lynn, 1994, Omerbašić et al., 2015) όσο και στα σπλάγχνα και στους βαθείς ιστούς (Pasricha, 2013, Mantyh, 2014). Η ηλεκτροφυσιολογική και ανατομική διερεύνηση μπορεί να εντοπίσει ποιος τύπος ινών, δεδομένου ότι οι ίνες C δεν έχουν μυελίνωση, είναι μικρής διαμέτρου και έχουν αργή ταχύτητα αγωγής. Διάφοροι τύποι ινών C έχουν χαρακτηριστεί σε θηλαστικά. Για παράδειγμα, ένας τύπος είναι

αποκλειστικά μηχανικά ευαίσθητος, ενώ ένας άλλος τύπος ανταποκρίνεται επίσης στο κρύο ή τη θερμότητα. Οι ίνες “Silent” C αποκρίνονται στη θερμότητα μόνο όταν ευαισθητοποιηθούν (Kress et al., 1992). Η πλειοψηφία των δερματικών τύπων ινών θηλαστικών έχουν αποκριτική λειτουργία (περίπου 67% του συνολικού τύπου ίνας (12% Αδ, 30% C-πολυτροπικό 20% C-μηχανόθερμο ή μόνο θερμότητα και 5% C σιωπηλό)) αφήνοντας 33% ως ίνες αφής και πίεσης (Kress et al., 1992, Cain et al., 2001, Lewin & Moshourab, 2004, Albers et al., 2006). Επομένως, το σύστημα κωδικοποίησης επιβλαβών ερεθισμάτων στα θηλαστικά πρέπει να είναι σε θέση να κάνει διάκριση μεταξύ τύπων επιβλαβών ερεθισμάτων αφού διαθέτουν μια σειρά ειδικών υποδοχέων για ερεθίσματα. Τα επίγεια θηλαστικά μπορεί να έχουν αναπτύξει αυτήν την ικανότητα να αποφεύγουν τα άκρα της ζέστης και του κρύου, καθώς και χημικές ουσίες και βλαβερά μηχανικά ερεθίσματα.

1.3 Καταπόνηση

Η καταπόνηση είναι ένα άλλο σημαντικό φαινόμενο που μπορεί να σχετίζεται με τον πόνο, αλλά δεν είναι συνώνυμο με αυτό (Dawkins, 1998). Η καταπόνηση μπορεί να είναι ευεργετική (Clark, Rager & Calpin, 1997), αλλά εμείς επικεντρωνόμαστε στην αρνητική καταπόνηση, η οποία έχει οριστεί ως «περιβαλλοντική επίδραση σε ένα άτομο, που υπερβάλλει τα συστήματα ελέγχου του και μειώνει την καταλληλότητά του ή φαίνεται πιθανό να το κάνει» (Broom & Johnson, 1993), οι αιτίες των οποίων είναι «επιβλαβείς εμπειρίες, που είναι κυρίως συναισθηματικές ή σωματικές ή έχουν σημαντικά συναισθηματικά και φυσικά συστατικά (π.χ. πόνος)» (Mellor & Stafford, 1999). Η καταπόνηση στα ψάρια, όπως και σε άλλα ζώα, σχετίζεται κυρίως με την απελευθέρωση κορτιζόλης, μια παράμετρο που συχνά μετράται για την εκτίμηση του στρες (Molony & Kent, 1997). Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα δεν σχετίζεται μόνο με το στρες (Colborn et al., 1991), αλλά εξαρτάται επίσης από τον κερκάρδιο ρυθμό τόσο στα θηλαστικά όσο και στα ψάρια (Pickering & Pottinger, 1983) και μπορεί να ποικίλει κατά την προσαρμογή στις αλλαγές της αλατότητας στα ψάρια (McCormick et al., 2008).

Παρόλο που γίνεται όλο και περισσότερη έρευνα με τη χρήση ψαριών, η καταπόνηση είναι ελάχιστα καθορισμένη για αυτά και για άλλες κατηγορίες

ποικιλόθερων ζώων, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. Η ομοιόσταση για ασθενή ψάρια αναφέρεται στη συνολική βιολογική και φυσιολογική ισορροπία ή στην ευζωία του ξενιστή στις περιβαλλοντικές του συνθήκες. Οι κτηνίατροι προσπαθούν να διατηρήσουν αυτήν την ισορροπία και προσπαθούν να διορθώσουν τις ανισορροπίες όταν παρουσιάζονται με ένα ασθενές ψάρι. Υπάρχουν πολλές μελέτες και είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα ψάρια ανταποκρίνονται στο στρες με φυσιολογικές ομοιότητες και διαφορές με άλλα ανώτερα και κατώτερα σπονδυλωτά. Η καταπόνηση για τα ασθενή ψάρια συνεπάγεται μια περίπλοκη ενσωμάτωση του ζώου και του περιβάλλοντός του. Αυτοί οι στρεσογόνοι παράγοντες μπορούν να χρησιμεύσουν για να απειλήσουν ή να διαταράξουν την ομοιόσταση του ζώου και να προκαλέσουν μια σειρά φυσιολογικών αποκρίσεων που προορίζονται να είναι προσαρμοστικές ή αντισταθμιστικές.

1.4 Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) είναι το βασικότερο μέρος ενός νευρικού συστήματος. Το ΚΝΣ παίζει το βασικότερο ρόλο στην επεξεργασία της πληροφορίας που λαμβάνεται από τις αισθήσεις του οργανισμού, στη ρύθμιση πολλών από τις λειτουργίες του, καθώς και στην εκδήλωση της σκέψης και της λογικής. Μαζί με το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ), ελέγχουν τη συμπεριφορά αλλά και τις περισσότερες από τις ζωτικές λειτουργίες ενός οργανισμού. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα διαθέτουν όλα τα αμφίπλευρα, δηλαδή όλα τα πολυκύτταρα ζώα εκτός από ζώα όπως οι σπόγγοι. Στα Χορδωτά αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, τα οποία περικλείονται στα οστά του κρανίου και της σπονδυλικής στήλης αντίστοιχα.

Από τα οστά που τους περιβάλλουν, οι ιστοί του ΚΝΣ χωρίζονται από τρεις στιβάδες, οι οποίες ονομάζονται μήνιγγες. Αυτές είναι:

1. Η εξωτερική και η πιο σκληρή, *σκληρή μήνιγγα*.
2. Η *αραχνοειδής μήνιγγα*, η οποία σχηματίζει μαζί με τη σκληρή μήνιγγα τον υποσκληρίδιο χώρο
3. Η *χοριοειδής μήνιγγα*, η οποία εφαρμόζει στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό

1.5 Οπιοειδή

Οπιοειδές είναι μια χημική ένωση, η οποία δεσμεύεται και επιδρά στους υποδοχείς οπιοειδών, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στο ΚΝΣ και τον γαστρεντερικό σωλήνα. Οι υποδοχείς σε αυτά τα δύο συστήματα οργάνων μεσολαβούν τόσο στις ευεργετικές και στις δυσμενείς επιδράσεις των οπιοειδών. Τα οπιοειδή συνεισφέρουν στη μειωμένη αντίληψη του πόνου, τη μειωμένη αντίδραση στον πόνο, όπως επίσης και στην αυξημένη ανοχή στον πόνο. Πιθανές παρενέργειες οι οποίες μπορεί να προκληθούν από τα οπιοειδή είναι η καταστολή, η αναπνευστική καταστολή και η δυσκοιλιότητα. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες ή παρενέργειες που είναι πιθανό να προκληθούν από τα οπιοειδή είναι η καταστολή βήχα, η οποία αποτελεί ακούσια παρενέργεια, καθώς και σωματική εξάρτηση η οποία προκαλείται από τη συνεχή χρήση οπιοειδών ουσιών.

1.5.1 Ταξινόμηση Οπιοειδών

Η ταξινόμηση των οπιοειδών χωρίζεται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες. Αυτές είναι:

- Φυσικά οπιούχα (μορφίνη, κωδεΐνη, θηβαΐνη)
- Ημισυνθετικά οπιοειδή (υδρομορφόνη, υδροκωδόνη, οξυκωδόνη, οξυμορφόνη, δεσομορφίνη, διακετυλομορφίνη (ηρωΐνη), νικομορφίνη, διπροπανοϋλομορφίνη, βενζυλομορφίνη, εθυλομορφίνη)
- Πλήρως συνθετικά οπιοειδή (φαιντανύλη, πεθιδίνη, μεθαδόνη, τραμαδόλη, δεξτροπροποξυφαΐνιο)
- Ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια (ενδορφίνες, εγκεφαλίνες, δυνορφίνες, ενδομορφίνες)
- Φάρμακα όπως το tramadol και το tapentadol, τα οποία χημικώς δεν ανήκουν στη κατηγορία των οπιοειδών, αλλά δρουν αγωνιστικά στον υποδοχέα μ-οπιοειδών.

1.6 Συνείδηση

Σύμφωνα με πολλούς ορισμούς του πόνου, η συνείδηση είναι η καθοριστική γραμμή μεταξύ της μετάδοσης επώδυνων ερεθισμάτων και του πόνου. Είναι το κύριο επίκεντρο της διένεξης για τον πόνο στα ψάρια επειδή η παρουσία της, σε αντίθεση με τη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων, δεν έχει ακόμη συμφωνηθεί στα ψάρια. Η συνείδηση είναι μια πολύ περίπλοκη έννοια που έχει πολλούς ορισμούς και εξακολουθεί να μην είναι πολύ καλά κατανοητή, ακόμη και στους ανθρώπους. Είναι τόσο περίπλοκο που υπάρχουν πολλά επιστημονικά περιοδικά αφιερωμένα στο θέμα, όπως το «Συνείδηση και Γνώση». Παρόλο που είναι το επίκεντρο της διένεξης, η συνείδηση, όπως ο πόνος, δεν καθορίζεται συχνά από τους συγγραφείς που εμπλέκονται στη διένεξη. Εδώ χρησιμοποιείται ένας γενικός ορισμός από ένα άρθρο κριτικής που δημοσιεύτηκε ως μέρος της διένεξης. Περιλαμβάνει δύο κύριες εκδηλώσεις συνείδησης που βασίζονται στον άνθρωπο:

- (i) πρωταρχική συνείδηση, τη στιγμή-προς-στιγμή επίγνωση των αισθητηριακών εμπειριών και ορισμένων εσωτερικών καταστάσεων όπως τα συναισθήματα και
- (ii) η ανώτερη συνείδηση, που ονομάζεται επίσης συνείδηση πρόσβασης ή αυτογνωσία.

Η ανώτερη συνείδηση περιλαμβάνει την επίγνωση του εαυτού ως οντότητας που υπάρχει ξεχωριστά από άλλες οντότητες. μια αυτοβιογραφική διάσταση, συμπεριλαμβανομένης της μνήμης των γεγονότων προηγούμενης ζωής, επίγνωση των γεγονότων, όπως το γλωσσικό λεξιλόγιο ενός ατόμου και ικανότητα σχεδιασμού και προσμονή του μέλλοντος (Rose et al., 2014).

Η Braithwaite (2010) υιοθέτησε ένα σχήμα που αναπτύχθηκε από τον Ned Block που διακρίνει τρεις μορφές συνείδησης:

- πρόσβαση στη συνείδηση, ως ικανότητα σκέψης για μια ψυχική κατάσταση. Αυτό θα περιελάμβανε τη δυνατότητα δημιουργίας ενός νοητικού χάρτη συνδυάζοντας διάφορα κομμάτια πληροφοριών και να συναχθεί από αυτόν τον νοητικό χάρτη καθοδήγηση για αποφάσεις, για παράδειγμα, να χρησιμοποιηθεί ένας νοητικός χάρτης του χωρικού περιβάλλοντος για να σχεδιάσει μια διαδρομή για τη μετάβαση από το Α στο Β. .

- Η φαινομενική συνείδηση, ως η ικανότητα να αισθανόμαστε περιβαλλοντικές και κοινωνικές πληροφορίες και να τις συνδέουμε με συναισθηματικές πληροφορίες, δηλαδή να βλέπουμε, να μυρίζουμε, να νιώθουμε. Ειδικά για την ικανότητα να αισθανόμαστε και να βιώνουμε συναισθήματα, ορισμένοι συγγραφείς στην επιστήμη της βιολογίας χρησιμοποιούν τον όρο «συναίσθηση».
- παρακολούθηση ή αυτοσυνείδηση, ως ικανότητα σκέψης των δικών μας ενεργειών.

1.7 Ευζωία των ψαριών

Τα ψάρια έχουν γίνει όλο και πιο δημοφιλή ζωικά μοντέλα στην έρευνα. Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση δεδομένων του Καναδικού Συμβουλίου για τη Φροντίδα των Ζώων (CCAC's), τα ψάρια είναι πλέον η μεγαλύτερη ομάδα όλων των ζώων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα στον Καναδά (CCAC, 2016), με τα ποντίκια να είναι κοντά στη δεύτερη. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ψάρια εργαστηρίου είναι το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*) (Lieschke & Currie, 2007) και η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Schartl, 2014). Είναι σημαντικά ερευνητικά μοντέλα σε μελέτες γενετικής, φυσιολογίας, τοξικολογίας, καρκίνων και παθολογίας. Ως εκ τούτου, εκτίθενται σε δυνητικά επιβλαβή ερεθίσματα που σχετίζονται με διάφορες ρουτίνες χειρουργικές επεμβάσεις, που περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε αυτά, βιοψία πτερυγίων, υποφυσεκτομή, γοναδεκτομή, εμφύτευση τηλεμετρικών συσκευών, καθετηριασμό της ραχιαίας αορτής και διαδικασίες σήμανσης. Επίσης, μολύνονται σκόπιμα από παθογόνους οργανισμούς για να μελετηθούν παθολογικοί αμυντικοί μηχανισμοί, καθώς και να αναπτυχθούν εμβόλια και θεραπείες (Dhar, Manna & Thomas Allnutt, 2014).

Η νομοθεσία, οι κανονισμοί και οι κατευθυντήριες γραμμές για την καλή μεταχείριση των ζώων έχουν δημιουργηθεί για τη διασφάλιση της ευζωίας των ψαριών στην έρευνα (π.χ., Batt et al., 2005, Jenkins et al., 2014, Lerner et al., 2004, National Health & Medical Research Council, 2013), ωστόσο, η καλή μεταχείριση των ψαριών εξακολουθεί να είναι ένας σχετικά νέος τομέας και λίγα είναι γνωστά για το τι ακριβώς συνιστά συνθήκη μη ευζωίας ή τι να κάνουμε γι 'αυτό (Huntingford et al., 2006).

Επιπλέον, η χρήση αναλγητικών στα ψάρια περιορίζεται από την έλλειψη φαρμακολογικών πληροφοριών που σχετίζονται με αναλγητικά φάρμακα και την κατάστασή τους ως χαμηλότερου οργανισμού στην κλίμακα αισθήσεων, καθώς και από τη συνεχιζόμενη διένεξη ως προς το εάν αισθάνονται πόνο ή όχι (Braithwaite, 2010, Rose et al., 2014). Αυτή η διένεξη έχει συνεχιστεί για αρκετά χρόνια και θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά την καλή διαβίωση των ψαριών, ωστόσο οι κτηνίατροι απουσιάζουν ως επί το πλείστον από αυτήν τη διένεξη. Τελικά, οι κτηνίατροι έχουν βασικό ρόλο σε αυτό το ζήτημα, καθώς είναι συνήθως αυτοί που είναι επιφορτισμένοι με τη δημιουργία και την επιβολή κανόνων (π.χ. τυποποιημένων διαδικασιών λειτουργίας) σχετικά με τη φροντίδα των ζώων στην έρευνα.

2. Απόδειξη αντίληψης του πόνου στα ψάρια

2.1 Η συμμετοχή του εγκεφάλου

Οι υποδοχείς επώδυνων ερεθισμάτων χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά σε τελεόστεα ψάρια το 2002 (Sneddon, 2002) και οι επακόλουθες εργασίες έδειξαν ότι είναι φυσιολογικά πανομοιότυπες με εκείνες των θηλαστικών, που ανταποκρίνονται σε ακραία θερμότητα, μηχανική πίεση και επιβλαβείς χημικές ουσίες (οξικό οξύ και δηλητήριο μελισσών Ashley et al., 2006, 2007, Sneddon 2003a, 2004, Sneddon et al., 2003a). Στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) υπάρχουν στο δέρμα σε όλο το κεφάλι και στον κερατοειδή του ματιού και έχουν χαρακτηριστεί στον πρόγονο των σύγχρονων ψαριών, τη λάμπραινα (*Petromyzon marinus*), στο οποίο οι αισθητηριακοί νευρώνες ανταποκρίθηκαν στο κάψιμο και το τρύπημα του δέρματος (Matthews & Wickelgren, 1978). Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ακόμη υποδοχείς σε ελασμοβράγχια (καρχαρίες, βάτους και ακτίνες).

Οι κύριες οδοί που μεταφέρουν πληροφορίες για τον πόνο από την περιφέρεια στον εγκέφαλο είναι η σπινθηλαμική οδός (σώμα) και η τριδυμική οδός (κεφάλι). Και τα δύο έχουν μελετηθεί σε άγνωστα, τελεόστεα και ελασμοβράγχια ψάρια (Sneddon, 2004, τρίδυμο στον κοινό κυπρίνο, *Cyprinus carpio*, Luiten 1975, σπινοθαλαμική οδός στις τριγλίδες, *Prionotus carolinus*, Finger, 2000). Οι ερευνητές έχουν προτείνει ότι οι αποκρίσεις στη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων στα ψάρια είναι απλώς

αντανακλαστικές και δεν ανεβαίνουν περισσότερο από το νωτιαίο μυελό ή τον οπίσθιο εγκέφαλο για να εμπλέξουν υψηλότερες περιοχές του εγκεφάλου (Rose, 2002).

Πρόσφατες μελέτες αντικρούουν αυτήν την ιδέα, καθώς η ηλεκτρική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια επιβλαβούς διέγερσης έχει καταγραφεί στον εγκέφαλο και στον μεσαίο εγκέφαλο της ιριδιζουσας πέστροφας, του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) και του σολομού του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (Dunlop & Laming, 2005, Nordgreen et al., 2007). Η ηλεκτρική δραστηριότητα διέφερε ανάλογα με τον τύπο ερεθίσματος (π.χ. απλή αφή έναντι επιβλαβών, δυνητικά οδυνηρών ερεθισμάτων).

Οι μοριακές τεχνικές έχουν επίσης δείξει ότι οι εγκέφαλοι της ιριδιζουσας πέστροφας και του κοινού κυπρίνου εμφανίζουν αλλαγές στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης (Reilly et al., 2008a), σύμφωνα με ξεχωριστές μετρήσεις στον πρόσθιο εγκέφαλο, στον μεσαίο εγκέφαλο και στον οπίσθιο εγκέφαλο τόσο κατά τη διάρκεια ενός επιβλαβούς ερεθίσματος όσο και για έως και 6 ώρες μετά. Οι περισσότερες από τις αλλαγές εμφανίστηκαν στον πρόσθιο εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι αυτή είναι η πιο σημαντική τοποθεσία στη φυσιολογική επεξεργασία επιβλαβών πληροφοριών και αντικατοπτρίζει τη σημασία του μετωπικού εγκεφάλου στην επεξεργασία πόνου στα θηλαστικά. Μαζί, αυτές οι μελέτες καταδεικνύουν ότι οι ανώτερες περιοχές του εγκεφάλου είναι που εμπλέκονται στην αντίδραση των ψαριών σε δυνητικά οδυνηρά συμβάντα και ότι η ανταπόκρισή τους δεν είναι απλό αντανακλαστικό.

Επιπλέον, οι ερευνητές έχουν εντοπίσει υποδοχείς οπιούχων και οπιοειδών στον εγκέφαλο των ψαριών (Alvarez et al., 2006, Buatti & Pasternak, 1981, Li et al., 1996, Porteros et al., 1999) καθώς και εγκεφαλικές (ενδογενείς) ουσίες στο χρυσόψαρο (Finger, 1981, Schulman et al., 1981) και την ιριδιζουσα πέστροφα (Vecino et al., 1991). Οι υποδοχείς οπιοειδών και οι ενδογενείς ουσίες είναι παρόντες στις νευρικές περιοχές που εμπλέκονται στην επεξεργασία πληροφοριών σχετικά με τον πόνο και τη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων στα θηλαστικά - τον νωτιαίο μυελό, τον πυρήνα της ράχης, τον δικτυωτό σχηματισμό, το περιαγωγικό γκρι και τον θαλάμο (Simantov et al., 1977). Οι εγκεφαλίνες στον εγκέφαλο των ψαριών παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο κατανομής με αυτό των ανώτερων σπονδυλωτών (Vecino et al., 1992). Στο νωτιαίο μυελό των ψαριών, η ανοσοαντιδραστικότητα που μοιάζει με εγκεφαλίνη είναι πιο πυκνή στο επιφανειακό τμήμα του ελάσματος A, το οποίο πιστεύεται ότι είναι παρόμοιο με τη ζελατινοειδή ουσία των θηλαστικών που είναι σημαντική για τη μετάδοση επώδυνων

ερεθισμάτων(Snow et al., 1996). Έτσι, υποδοχείς οπιοειδών και ενδογενείς ουσίες υπάρχουν στο νευρικό σύστημα των ψαριών (Gonzalez-Nunez & Rodríguez, 2009).

2.1.1 Διαφορές στη συμπεριφορά και στη φυσιολογία

Αλλαγές στη συμπεριφορά που δείχνουν μια προστατευτική λειτουργία σε απόκριση σε ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν είναι σημαντικοί δείκτες ενός αρνητικού συναισθηματικού συστατικού που σχετίζεται με την αισθητηριακή εμπειρία. Έτσι, η ικανότητα να μάθει να αποφεύγει ένα επιβλαβές ερέθισμα είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης για το εάν ένα ζώο βιώνει ένα ερέθισμα ως αποτρεπτικό και μελέτες που χρησιμοποιούν κλασική ρύθμιση με αρνητική ενίσχυση έχουν δείξει ότι τα τελεόστεα ψάρια είναι ικανά να μάθουν να αποφεύγουν ένα επιβλαβές ερέθισμα (Sneddon, 2004). Για παράδειγμα, οι Ehrensing et al. (1982) έδειξαν ότι το χρυσόψαρο έμαθε να αποφεύγει ηλεκτροπληξία, αλλά ότι η εκμάθηση δεν συνέβη όταν έλαβε την αναλγητική μορφίνη. Η αποτρεπτική φύση του ερεθίσματος ήταν σημαντική για τη μάθηση και την ενοποίηση της μνήμης. Ομοίως, η ιριδιζούσα πέστροφα, ο κοινός κυπρίνος και το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*) που βίωσαν μια επιβλαβή διέγερση εμφάνισαν ταχείες αλλαγές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά που κράτησαν έως και 6 ώρες (Reilly et al., 2008b, Sneddon et al., 2003a, b) και έτσι δεν ήταν απλά αντανακλαστικά. Σε άλλες μελέτες, η ιριδιζούσα πέστροφα που έλαβε μια ένεση αραιού οξικού οξέος στα άνω και κάτω μετωπικά χείλη έτριβε την πληγείσα περιοχή στα διαθέσιμα υποστρώματα (Ashley et al., 2009, Sneddon, 2003a). Αντιθέτως, τα ψάρια που εγχύθηκαν με αλατούχο διάλυμα δεν έδειξαν αυτήν την ανώμαλη συμπεριφορά, η οποία μπορεί να είχε τη λειτουργία της μείωσης της έντασης της επιβλαβούς αίσθησης, όπως έχει περιγραφεί σε ανθρώπους και θηλαστικά που τρίβουν μια πληγείσα περιοχή για να μειώσουν τον πόνο (Roveroni et al., 2001).

Η μείωση της κολύμβησης και άλλων δραστηριοτήτων στην ιριδιζούσα πέστροφα και στο ψάρι ζέβρα μπορεί να έχει επίσης προστατευτικό ρόλο όσον αφορά την ενεργειακή δαπάνη (επιτρέποντας την εκτροπή της ενέργειας σε ανάκαμψη) και την πρόληψη περαιτέρω ζημιών και πόνου (Ashley et al., 2009, Reilly et al., 2008b, Sneddon et al., 2003a). Η πέστροφα ανέστειλε την κανονική συμπεριφορά σίτισης μετά την ένεση οξέος στα χείλη και συνέχισε να τρέφεται μόνο όταν υποχώρησαν οι

ανεπιθύμητες αλλαγές στη φυσιολογία (Sneddon, 2003b, Sneddon et al., 2003a) Μια τέτοια αλλαγή συμπεριφοράς μπορεί να έχει προστατευτική λειτουργία συγκρίσιμη με τη συμπεριφορά προστασίας σε ένα ζώο που μειώνει τη χρήση μιας επώδυνης περιοχής ή άκρου για να την προστατεύσει από περαιτέρω πόνο ή τραυματισμό. Τα πουλιά, τα θηλαστικά και οι άνθρωποι εμφανίζουν συμπεριφορά φύλαξης (Banik et al., 2005, Shega et al., 2008, Wylie & Gentle, 1998).

Τα ψάρια που βιώνουν ένα επιβλαβές ερέθισμα εμφανίζουν επίσης μια δραματική αύξηση του ρυθμού αερισμού των βραγχίων (αριθμός κτύπων των βραγχίων ανά λεπτό). Στην πέστροφα και το ψάρι ζέβρα, για παράδειγμα, σχεδόν διπλασιάζεται από τους κανονικούς ρυθμούς (Ashley et al., 2009, Reilly et al., 2008, Sneddon, 2003b, Sneddon et al., 2003a). Η πέστροφα συνήθως εμφανίζει αυτά τα ποσοστά μόνο στη μέγιστη ταχύτητα κολύμβησης (Altimiras & Larson, 2000), αλλά τα ψάρια που ανταποκρίνονται σε επιβλαβή ερεθίσματα έδειξαν μείωση της δραστηριότητας. Η χορήγηση αναλγησίας (μορφίνης) μείωσε σημαντικά όλες τις αλλαγές συμπεριφοράς και φυσιολογίας που περιγράφονται παραπάνω, αποδεικνύοντας περαιτέρω ότι οφείλονταν συγκεκριμένα στον πόνο (Sneddon, 2003b).

Πιο πρόσφατες μελέτες προσπάθησαν να προσδιορίσουν τη σημασία αυτών των επιβλαβών διεγέρσεων στα ψάρια. Χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικά ερεθίσματα, οι ερευνητές έδειξαν ότι οι απαντήσεις στον πόνο υπερέχουν της πέστροφας που είχε βιώσει επιβλαβή ερεθίσματα, ενώ τα ψάρια δεν έδειξαν την κατάλληλη απόκριση φόβου είτε αποφεύγοντας νέα αντικείμενα είτε επιδεικνύοντας συμπεριφορά κατά του αρπακτικού (Ashley et al., 2009, Sneddon et al., 2003b, Ashley & Sneddon, 2007). Μελέτες σε χρυσόψαρο και πέστροφα έδειξαν ότι μπορούν να μάθουν να αποφεύγουν επιβλαβή ηλεκτροπληξία, καθώς απέφυγαν να εισέλθουν στην περιοχή όπου δόθηκε το σοκ ακόμα και όταν υπήρχε φαγητό (Millsopp & Laming, 2008). Ωστόσο, η συμπεριφορά αποφυγής εξαρτιόταν από τα επίπεδα πείνας, καθώς προηγουμένως θα είχαν μπει για να πάρουν τη τροφή αν λιμοκτονούσαν. Μαζί, αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν ήταν σημαντικό για τα ψάρια, αλλάζοντας τόσο τη συμπεριφορά τους όσο και τη φυσιολογία τους και επηρεάζοντας επιβλαβώς τις φυσιολογικές συμπεριφορές τους.

2.1.2 Παρατηρήσιμες ενδείξεις πόνου

Οι περισσότερες αλλαγές συμπεριφοράς στα ψάρια μετά από επιβλαβή διέγερση συμβαίνουν στην περίοδο αμέσως μετά τη θεραπεία για έως και 120 λεπτά, με μέγιστη από 60 έως 90 λεπτά. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν ανώμαλες συμπεριφορές όπως τρίψιμο της πληγείσας περιοχής, κύλισμα στο υπόστρωμα και πέρα από τα δύο θωρακικά πτερύγια και λιγότερο κολύμπι. Αυτές οι συμπεριφορές είναι εμφανείς και εύκολα παρατηρήσιμες εάν τα ψάρια βρίσκονται σε γυάλινες δεξαμενές. Η παρατήρηση είναι πιο δύσκολη σε αδιαφανείς δεξαμενές και σε μεγάλο αριθμό ψαριών. Η μείωση της δραστηριότητας είναι εύκολα μετρήσιμη, αλλά απαιτεί ένα υπάρχον μέτρο φυσιολογικής συμπεριφοράς. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες καταγράφουν βασικές παρατηρήσεις για 15 έως 30 λεπτά, οπότε αυτό δεν είναι συνήθως πολύ δαπανηρό από την άποψη του χρόνου, αν και η αξιολόγηση του υψηλού αριθμού ψαριών θα απαιτούσε περισσότερο χρόνο.

Ένας άλλος ισχυρός δείκτης που μπορεί εύκολα να μετρηθεί είναι ο ρυθμός αερισμού βραγχίων. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, ένας κανονικός μέσος ρυθμός 54 παλμών / λεπτό αυξήθηκε σε πάνω από 90 παλμούς / λεπτό μετά από ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν (Sneddon et al., 2003a). Το ψάρι ζέβρα παρουσίασε παρόμοια αλλαγή στο ρυθμό αερισμού, ενώ ο κοινός κυπρίνος δεν έδειξε τέτοια αλλαγή (Reilly et al., 2008b).

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν συγκεκριμένες ειδικές απαντήσεις και την αναγκαιότητα ουσιαστικών και αξιόπιστων δεικτών αξιολόγησης πόνου για οποιοδήποτε ζώο ώστε να είναι δυνατή η άμεση ανίχνευση και παρέμβαση. Ωστόσο, οι τρέχουσες μελέτες συμπεριφοράς για τον πόνο στα ψάρια περιορίζονται σε έναν πολύ μικρό αριθμό ειδών (πέστροφα, κοινός κυπρίνος και ψάρι ζέβρα) και σε ένα μοντέλο πόνου (υποδόρια ένεση οξικού οξέος) (Reilly et al., 2008b, Sneddon, 2003b, Sneddon et al., 2003a). Υπάρχει σημαντική ανάγκη για περισσότερη έρευνα για να συμπεριληφθεί ένα ευρύτερο φάσμα ειδών, διαφορετικά μέτρα πόνου και διαφορετικά μοντέλα πόνου (π.χ., επιβλαβής διέγερση πτερυγίων και σώματος, ψαλίδισμα πτερυγίων ή άλλη βλάβη ιστού, ασθένεια και προσβολή από παράσιτα).

2.2 Έρευνα για τον πόνο των ψαριών

Πριν από το 2002 πιστεύεται ότι τα ψάρια δεν μπορούσαν να αντιληφθούν τον πόνο, επειδή δεν είχαν αναγνωρισθεί οι υποδοχείς που κατά προτίμηση ανιχνεύουν δυνητικά οδυνηρά ερεθίσματα (Rose, 2002). Ωστόσο, χρησιμοποιώντας ηλεκτροφυσιολογία και νευροανατομικές προσεγγίσεις, στη συνέχεια εντοπίστηκαν οι υποδοχείς σε ένα τελεόστεο, την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), για πρώτη φορά (Sneddon, 2002, Sneddon, 2003a). Προηγούμενη έρευνα διαπίστωσε ότι οι υποδοχείς ανταποκρίνονται σε βλαβερά ερεθίσματα σε ένα άγνωθα ψάρι, τη λάμπραινα (Matthews & Wickelgren, 1978), αλλά άλλες μελέτες δεν κατάφεραν να βρουν υποδοχείς σε ελασμοβράγχια χρησιμοποιώντας νευροανατομία, όπου υπάρχει απουσία μη-ελαστικοποιημένων ινών C, που δρουν ως ένα τύπος υποδοχέων σε θηλαστικά (π.χ. Snow et al., 1996). Οι υποδοχείς της πέστροφας ήταν δύο τύπων ινών, οι ίνες C και οι μικρής διαμέτρου μυελινωμένες ίνες A-δέλτα, με τρεις κατηγορίες υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των πολυτροπικών (που ανταποκρίνονται σε μηχανικά, θερμικά και χημικά ερεθίσματα), μηχανοθερμικά (χωρίς απόκριση σε χημικά) και μηχανοχημικά (καμία απόκριση στη θερμοκρασία) (Sneddon, 2003a, Ashley et al., 2006, 2007, Mettam et al., 2012).

Οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των υποδοχέων πέστροφας είναι συγκρίσιμες με αυτές που βρέθηκαν σε μοντέλα θηλαστικών (Sneddon, 2004, 2012). Διαφορές συμβαίνουν στο ότι οι υποδοχείς της πέστροφας δεν ανταποκρίνονται σε ψυχρές θερμοκρασίες κάτω των 4 ° C (Ashley et al., 2007). Αυτό το είδος μπορεί να αντιμετωπίσει πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και, επομένως, εξελικτικά, θα ήταν προσαρμοστικό να μην ανταποκρίνονται οι υποδοχείς των ψαριών. Θα ήταν ενδιαφέρον να δοκιμάσουμε ένα τροπικό είδος ψαριού, καθώς δεν θα είχαν εξελιχθεί για να ανέχεται τέτοια ακραία κρύα. Μελέτες ανατομίας και ηλεκτροφυσιολογίας διαπίστωσαν ότι ένα μικρό ποσοστό των υποδοχέων των ψαριών νευρώνονται από ίνες C (4-5%, Sneddon, 2002, Roques et al., 2010), σε αντίθεση με τα χερσαία σπονδυλωτά όπου περίπου το 50% των υποδοχέων είναι ίνες C (Young, 1977), αν και τα ερπετά έχουν πολύ λιγότερες ίνες C (Terashima & Liang, 1994). Οι ίνες C στα θηλαστικά συμβάλλουν στον βαρυ πόνο που «ξεχειλίζει» ενώ οι ταχύτερες αγωγίμες ίνες A-δέλτα πιστεύεται ότι σηματοδοτούν «πρώτο» πόνο στο ΚΝΣ. Οι σκεπτικιστές έχουν προτείνει ότι ο μικρός αριθμός ινών C σημαίνει ότι τα ψάρια δεν νιώθουν πόνο (Rose et al.,

2014). Δεδομένων των διαφορών στον τρόπο ζωής, τη μορφολογία και ούτω καθεξής, η νευροανατομία των ψαριών δεν είναι ίδια με το ανθρώπινο σύστημα. Ωστόσο, οι ίνες A-δέλτα μεταφέρονται με μεγαλύτερη ταχύτητα, οπότε ίσως το σύστημα ψαριών είναι πιο γρήγορο και αποτελεσματικό. Κατά την εξέταση της οικολογίας, του ιστορικού ζωής και των εξελικτικών πιέσεων, τα ψάρια ζουν σε έναν υδατικό κόσμο και ως εκ τούτου θα υπάρχει διαφορά στον τρόπο με τον οποίο συμβαίνει βλάβη στα ψάρια σε σύγκριση με τα χερσαία ζώα. Η πλευστότητα των ψαριών στο νερό σημαίνει λιγότερη ζημιά λόγω βαρύτητας (πτώση), οι επιβλαβείς χημικές ουσίες μπορεί να είναι πιο αραιωμένες σε υδρόβια υδάτινα σώματα και οι αλλαγές στη θερμοκρασία είναι λιγότερο δραματικές σε σύγκριση με τα χερσαία περιβάλλοντα. Έτσι, πόνος από τη βαρύτητα, ακραίες θερμοκρασίες και επιβλαβή χημικά μπορεί να βιώσουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα επίγεια ζώα. Αυτή είναι απλώς μια υπόθεση, αλλά ανεξάρτητα από αυτό, οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες πέστροφας δείχνουν ξεκάθαρα ότι οι ίνες A-δέλτα της πέστροφας δρουν με τον ίδιο τρόπο όπως οι ίνες C των θηλαστικών, αντιδρώντας σε μια ποικιλία επιβλαβών ερεθισμάτων, και πολλές είναι πολυτροπικοί υποδοχείς (Sneddon, 2002, 2003a, b, Ashley et al., 2006, 2007, Roques et al., 2010, Mettam et al., 2012).

Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες μελέτες ανατομίας και ηλεκτροφυσιολογίας έχουν διεξαχθεί σε τελεόστεα ψάρια και σχετικά λίγες σε ελασμοβράγχια. Τα πολύ λίγα δημοσιευμένα ευρήματα τείνουν να λείπουν από πειραματική λεπτομέρεια (Leonard, 1985). Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη στον βάτο, *Himantura fai*, επιβεβαίωσε ορισμένα από τα προηγούμενα πειράματα στο ότι υπάρχει έλλειψη μη μυελιωμένων ινών C, αλλά μικρές μυελιωμένες ίνες είναι σε αφθονία και θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι ίνες A-δέλτα (Kitchener et al., 2010). Εντούτοις, απαιτούνται μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας για να προσδιοριστεί εάν υπάρχουν αλγυποδοχείς σε αυτήν την ομάδα. Ίσως επειδή πολλοί καρχαρίες, σαλάχια και ακτίνες εμπλέκονται στο δάγκωμα, προκαλώντας συχνά εκτεταμένους τραυματισμούς κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής και της ερωτοτροπίας, αυτή η ομάδα έχει χάσει την ικανότητα ή έχει περιορισμένη αντίληψη για πόνο (π.χ. Kajiura et al., 2000, Porcher, 2005). Αυτό, σε συνδυασμό με στοιχεία που δείχνουν ότι η επούλωση είναι σχετικά αργή (Heupel et al., 1998, Ashhurst, 2004), σημαίνει ότι η βλάβη των ιστών μπορεί να είναι λιγότερο προβληματική από ότι σε άλλα είδη. Ωστόσο, ο Porcher (2005) ανέφερε ότι οι βλάβες

στο πτερύγιο του μαυροπτερύγου υφαλοκαρχαρία, *Carcharhinus melanopterus*, επουλώθηκαν εντός 10 ημερών. Αυτά τα ευρήματα στα ελασμοβράγχια είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα επειδή ο εξελικτικός προκάτοχος τόσο των τελεόστεων όσο και των ελασμοβράγχιων, η λάμπραινα, έχει υποδοχείς (Matthews & Wickelgren, 1978). Προσοχή πρέπει να δοθεί στον αποκλεισμό της έλλειψης μετάδοσης επώδυνων ερεθισμάτων σε καρχαρίες, σαλαχια και ακτίνες, δεδομένου του πολύ περιορισμένου αριθμού δημοσιευμένων μελετών.

Αρκετές μελέτες ιχνηλάτησης της οδού έχουν δείξει ότι οι νευροανατομικές οδοί των ψαριών από τις περιφερειακές περιοχές προς τον εγκέφαλο είναι εξαιρετικά διατηρημένες. Στον βάτο με μακριά ουρά τα διακριτά στρώματα του ραχιαίου κέρατος είναι εμφανή όπως φαίνεται στο ισοδύναμο του νωτιαίου μυελού των θηλαστικών και η συναπτική υπερδομή είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με αυτή του ραχιαίου κέρατος των τρωκτικών και άλλων θηλαστικών (Kitchener et al., 2010). Οι κύριες οδοί, συμπεριλαμβανομένου του σπινοθαλαμικού και του τριδύμου, που μεταφέρουν πόνο από το σώμα και το πρόσωπο, αντίστοιχα, είναι οργανωμένες με παρόμοιο τρόπο (Sneddon, 2004) και εντός του εγκεφάλου των τελεόστεων υπάρχουν διάφορες συνδέσεις με τον θάλαμο και τις περιοχές του φλοιού (Rink & Wullimann, 2004) που νευρώνουν την επεξεργασία του πόνου στα θηλαστικά. Επιπλέον, πολλαπλές περιοχές του εγκεφάλου είναι ενεργές κατά τη διάρκεια επιβλαβούς διέγερσης (π.χ. μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον πρόσθιο εγκέφαλο, τον μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο του κοινού κυπρίνου, *Cyprinus carpio* και της ιριδίζουσας πέστροφας (Reilly et al., 2008a), ηλεκτρική δραστηριότητα σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου στον σολομό του Ατλαντικού, *Salmo salar* (Nordgreen et al., 2007), το χρυσόψαρο *Carassius auratus* και ιριδίζουσα πέστροφα (Dunlop και Laming, 2005), δραστηριότητα με χρήση λειτουργικής απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (fMRI) στον κοινό κυπρίνο (Sneddon, 2011)). Έτσι, η δραστηριότητα διαφέρει από αυτή ως απόκριση σε αβλαβή ερεθίσματα και δεν περιορίζεται στα αντανακλαστικά κέντρα του οπισθοεγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (Rose, 2002). Πιο περίπλοκες αποκρίσεις εμφανίζονται σε ολόκληρο τον εγκέφαλο, πιθανώς νευρώνοντας τις παρατεταμένες συμπεριφορικές αποκρίσεις. Επιπλέον, μια σειρά αναλγητικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στη βελτίωση των αλλαγών συμπεριφοράς και φυσιολογίας που σχετίζονται με τον πόνο που παρατηρούνται στα ψάρια όταν διεγείρονται επώδυνα

(Sneddon, 2003b, Sneddon et al., 2003a, Mettam et al. , 2011, Sneddon, 2012). Οι υποδοχείς οπιοειδών καθώς και η δράση των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) στο ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX2) διατηρούνται επίσης σε μεγάλο βαθμό μεταξύ ψαριών και θηλαστικών (Malafoǵlia et al., 2013). Έτσι, η νευρική συσκευή πόνου στα ψάρια είναι άμεσα συγκρίσιμη με το σύστημα των θηλαστικών και λειτουργεί παρόμοια.

Κατά τη διερεύνηση των συμπεριφορικών και φυσιολογικών αντιδράσεων ολόκληρου του ζώου σε δυνητικά επώδυνα ερεθίσματα, υπάρχουν πολλά στοιχεία για την απομάκρυνση των ψαριών από ένα επιβλαβές γεγονός. Ο κοινός κυπρίνος (*C. carpio*) αποσύρθηκε από την ηλεκτρική διέγερση με μειωμένες αποκρίσεις μετά τη χορήγηση αναισθητικού, ωστόσο η κανονική κινητική δραστηριότητα δεν επηρεάστηκε (Chernova & Lapshin, 2011). Τα ψάρια μαθαίνουν να αποφεύγουν την ηλεκτροπληξία συνήθως σε μία ή λίγες δοκιμές (π.χ. Yoshida & Hirano, 2010). Αυτή η συμπεριφορά αποφυγής επιμένει για έως και 3 ημέρες (Dunlop et al., 2006), αλλά μετά από 3 ημέρες στέρησης τροφής τα ψάρια θα κινδυνεύουν να εισέλθουν στη ζώνη κλονισμού για να λάβουν τροφή (Millsopp και Laming, 2008). Αυτό αποδεικνύει ότι τα τελεοστοειδή ψάρια βρίσκουν τα ηλεκτροσόκ τόσο αποτρεπτικά που αλλάζουν τη μετέπειτα συμπεριφορά τους. Μεταξύ των καρχαριών και των ακτίνων, οι αμπούλες του Lorenzini ανιχνεύουν ηλεκτρικά πεδία χαμηλής συχνότητας (δηλαδή 0,5 Hz) (Murray, 1962, Kalmijn, 1971, von der Emde, 1998). Τα ελασμοβράγχια διαθέτουν οξεία ευαισθησία στα ηλεκτρικά πεδία, διευκολύνοντας την ανάπτυξη συσκευών απώθησης καρχαρία (SRDs) που δημιουργούν ένα ηλεκτρικό πεδίο γύρω από τον χρήστη για να αποτρέψουν την επίθεση μεγάλων καρχαριών. Η έκθεση σε SRD οδηγεί σε μυϊκούς σπασμούς και παρακινεί τους καρχαρίες να εγκαταλείψουν την περιοχή (www.sharkshield.com, Broad et al., 2010). Είναι άγνωστο εάν αυτό είναι παθητικό ή όχι.

Η in vivo χορήγηση δυνητικά επώδυνων ερεθισμάτων οδηγεί σε παρατεταμένες, περίπλοκες αποκρίσεις (Sneddon, 2009). Ο αερισμός των βραγχίων αυξάνεται δραματικά περισσότερο απ' ό,τι σε μια απόκριση στρες στην ιριδιζουσα πέστροφα και το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*) όταν τους εγχέονται επιβλαβείς χημικές ουσίες. Επιπλέον, μια αύξηση στην κορτιζόλη του πλάσματος έχει καταγραφεί στην ιριδιζουσα πέστροφα (Sneddon, 2003b, Ashley et al., 2009) και στην τιλάπια Μοζαμβίκης (*Oreochromis*

niloticus) (Roques et al., 2012). Οι συμπεριφορικές αποκρίσεις επηρεάζονται επίσης. Για παράδειγμα, μειωμένη κολύμβηση που παρατηρήθηκε μετά από επώδυνη θεραπεία (Sneddon, 2003b, Reilly et al., 2008b, Correia et al., 2011, Roques et al., 2012). Η συμπεριφορά φύλαξης (όπως η αποφυγή χρήσης μιας περιοχής στην οποία έχει χορηγηθεί επώδυνο ερέθισμα) έχει καταγραφεί σε πέστροφες, οι οποίες αποφεύγουν να τραφούν μετά από μια επώδυνη ένεση στα χείλη για έως και 3 ώρες (Sneddon, 2003b). Οι μάρτυρες με εικονικό χειρισμό (μόνο αναισθητοποιημένοι) και με ένεση φυσιολογικού ορού, συνεχίζουν τη σίτιση μετά από 80 λεπτά, όπως και τα ψάρια με ένεση οξέος όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με παυσίπονο.

Επειδή τα ψάρια δεν τρέφονται όταν πονάνε (Sneddon, 2009), είναι δύσκολο να επιχειρήσουμε τον τύπο αναλγητικών παραδειγμάτων αυτοχορήγησης όπου το παυσίπονο χορηγείται στο νερό ή στη τροφή και τα ζώα μπορούν να επιλέξουν μόνα τους το φαρμακωμένο νερό ή τη τροφή για να μειώσουν τον πόνο (Pham et al., 2010). Ωστόσο, θα πληρώσουν τα ψάρια ένα κόστος για την πρόσβαση στην αναλγησία; Εάν η εσωτερική εμπειρία του πόνου είναι αποτρεπτική, τότε θα πρέπει να θυσιάσουν είτε την προσπάθεια είτε την πρόσβαση σε έναν πόρο ή μια ευνοϊκή περιοχή για να επιτύχουν ανακούφιση από τον πόνο. Το ψάρι ζέβρα (*zebrafish*), δεδομένης της επιλογής μεταξύ ενός γυμνού, φωτεινού θαλάμου ή ενός λιγότερο φωτισμένου, εμπλουτισμένου θαλάμου με παρακινητικό ερέθισμα και με εμπλουτισμό χαλικιών και φυτών, επέλεξε τον εμπλουτισμένο θάλαμο και περνούσε τον περισσότερο χρόνο του εκεί σε διαδοχικές περιπτώσεις (Sneddon, 2012). Όταν αυτά τα ψάρια έλαβαν είτε οξύ είτε φυσιολογικό ορό ως αβλαβή θεραπεία, εξακολουθούσαν να επιλέγουν τον εμπλουτισμένο θάλαμο που προτιμούσαν. Ωστόσο, τα ψάρια ζέβρα που υποβλήθηκαν σε επώδυνη θεραπεία έχασαν την προτίμησή τους για την προτιμώμενη περιοχή και περνούσαν τον περισσότερο χρόνο τους στον δυσμενή, γυμνό θάλαμο, εάν ένα αναλγητικό, η λιδοκαΐνη, διαλυόταν στο νερό αυτού του θαλάμου. Οι μάρτυρες που δεν διεγέρθηκαν επιβλαβώς αλλά είχαν πρόσβαση στον άγονο θάλαμο με δόση λιδοκαΐνης δεν έχασαν την προτίμησή τους και περνούσαν τον περισσότερο χρόνο τους στον εμπλουτισμένο θάλαμο, αποδεικνύοντας ότι δεν ήταν ούτε εθιστικό ούτε καταπραΰντικό αποτέλεσμα της λιδοκαΐνης που είχε ως αποτέλεσμα τα ζώα που υποβάλλονται σε επώδυνη θεραπεία να περνούν τον περισσότερο χρόνο τους σε μια δυσμενή περιοχή. Αυτό υποδηλώνει ότι τα ψάρια ζέβρα επιδιώκουν να μειώσουν τον πόνο τους παρατώντας

την ευκαιρία να βρίσκονται σε μια προτιμώμενη περιοχή και περνώντας χρόνο σε έναν μη προτιμώμενο θάλαμο για πρόσβαση στην αναλγησία.

Εάν ο πόνος είναι σημαντικός για τα ψάρια, τότε θα πρέπει να εκτελούν άλλες ανταγωνιστικές εργασίες λιγότερο καλά ή να τις αγνοούν. Η πέστροφα αγνοεί νέα αντικείμενα αντί να δείχνει αποουγή όταν πονάει. Ωστόσο, παρουσιάζεται αποφυγή εάν χορηγηθεί μορφίνη στα ψάρια (Sneddon et al., 2003a). Η συμπεριφορά κατά των θηρευτών όπως η αναζήτηση κάλυψης και η συμπεριφορά διαφυγής μειώνονται όταν η πέστροφα διεγείρεται επιβλαβώς (Ashley et al., 2009). Οι κοινωνικά υποδεέστερες πέστροφες με υψηλές συγκεντρώσεις κορτιζόλης στο πλάσμα δεν παρουσιάζουν σχεδόν κανένα σημάδι πόνου, πιθανώς λόγω ενδογενούς αναλγησίας (Ashley et al., 2009). Αυτές οι μελέτες σε συνδυασμό δείχνουν ότι ο πόνος έχει προτεραιότητα έναντι των ανταγωνιστικών ερεθισμάτων και ότι οι κεντρικοί μηχανισμοί μπορεί να ενεργοποιηθούν για να ανακουφίσουν τον πόνο. Κατά την εξέταση όλων των εμπειρικών αποδείξεων μαζί, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι τα τελεόστεα ψάρια πληρούν τα κριτήρια για τον πόνο των ζώων όπως προτείνεται από τους Sneddon et al. (2014).

2.3 Κριτήρια για την μετάδοση επώδυνων νευρικών ερεθισμάτων και τον πόνο

Πολλοί επιστήμονες έχουν συζητήσει εκτενώς τα κριτήρια που πρέπει να πληροί μια ομάδα ζώων για να πληροί τις απαιτήσεις για τη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων και τον πόνο. Προφανώς, όλες οι ομάδες ζώων διαθέτουν αλγοϋποδοχείς και πολλά μοντέλα ασπόνδυλων έχουν δώσει σημαντικές γνώσεις σχετικά με τη λειτουργία των αλγοϋποδοχέων (π.χ. το σαλιγκάρι της ξηράς, Kavaliers et al., 2000). Ωστόσο, ο πόνος είναι ένα πολύ πιο περίπλοκο φαινόμενο και δεδομένου ότι τα ζώα δεν μπορούν να μας πουν ότι πονούν, αυτά τα κριτήρια έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν έναν οδηγό ως προς το εάν το ζώο μπορεί να βιώσει πόνο. Αυτά τα κριτήρια βασίζονται στα κριτήρια του Bateson (1992), που παρουσιάζονται παρακάτω:

- Υποδοχείς επώδυνων ερεθισμάτων
- Εγκεφαλικές δομές
- Μονοπάτια προς ανώτερες δομές του εγκεφάλου
- Υποδοχείς οπιοειδών και ουσίες

- Τα αναλγητικά μειώνουν την απόκριση σε επώδυνα ερεθίσματα
- Εκμάθηση αποφυγής
- Αναστολή φυσιολογικής συμπεριφοράς

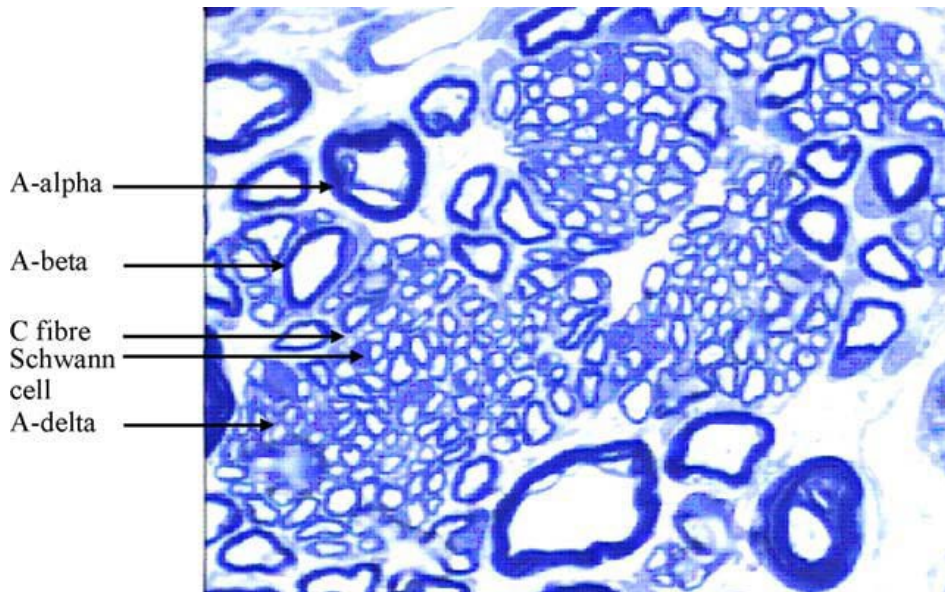
2.3.1 Υποδοχείς επώδυνων ερεθισμάτων

Οι αλγοϋποδοχείς σχετίζονται με ελεύθερες νευρικές απολήξεις και είναι συνήθως δύο τύπων ινών, μικρές μυελινωμένες ίνες Α-δέλτα και μικρότερες μη μυελινωμένες ίνες C (Lynn, 1994). Στα συστήματα θηλαστικών, οι ίνες C μπορεί να κυμαίνονται σε διάμετρο από 0,2 έως 3,0 μm ενώ οι μεγαλύτερες ίνες Α-δέλτα κυμαίνονται από 2 έως 14 μm (Lynn, 1994). Η ταχύτητα αγωγής των μικρότερων ινών C στα θηλαστικά είναι περίπου 0,3 έως 1,2 m/s, ενώ η αγωγή του Α-δέλτα με ταχύτητα 5 έως 30 m/s. Το σώμα του τελεόστρου ψαριού καλύπτεται από ελεύθερες νευρικές απολήξεις άγνωστης λειτουργίας (Whitear, 1983), ωστόσο λίγες μελέτες έχουν εξετάσει την ανατομία για την παρουσία ινών Α-δέλτα ή C σε αυτήν την ομάδα. Μια τέτοια μελέτη για την ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*, εξέτασε το τρίδυμο νεύρο και βρήκε και τους δύο τύπους ινών και στους τρεις κύριους κλάδους του τριδύμου νεύρου (Sneddon, 2002). Αυτές οι ίνες ταιριάζουν με το εύρος μεγέθους που βρέθηκε στα ανώτερα σπονδυλωτά (Εικόνα 1). Οι περισσότερες άλλες μελέτες για την ανατομία των περιφερικών νεύρων έχουν εξετάσει τα ελασμοβράγχια και έχουν ανακαλύψει έλλειψη ινών C, παρόλο που υπάρχουν ίνες Α-Δέλτα (π.χ. ακτίνες, *Dasyatis sabina*, *Aetobatus narinari*, *Rhinoptera bonasus*, *Himantura sp.* (Coggeshall et al., 1978, Leonard, 1985, Snow et al., 1996). Οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες απέτυχαν επίσης να βρουν αργά προσαρμόσιμους μηχανοϋποδοχείς, μια ιδιότητα των αλγοϋποδοχέων των θηλαστικών ή υποδοχείς που ανταποκρίνονταν στις αυξήσεις της θερμοκρασίας στον βάτο (Coggeshall et al., 1978, Snow et al., 1996). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες για την ιριδίζουσα πέστροφα όπου η πλειονότητα των υποδοχέων που νευρώθηκαν από το τρίδυμο νεύρο προσαρμόστηκαν αργά καθώς και 22 δεκτικά πεδία από ένα σύνολο 58 που ανταποκρίνονταν σε επιβλαβή θερμότητα (Sneddon, 2003a, Sneddon, 2003b) (Εικόνα 2). Από αυτά τα 22 δεκτικά πεδία, τα 18 ανταποκρίθηκαν επίσης στην εφαρμογή οξικού οξέος και μπορούσαν να ταξινομηθούν ως πολυτροπικοί αλγοϋποδοχείς ενώ τα υπόλοιπα 4 δεν ανταποκρίθηκαν στο οξύ και μπορούσαν να ταξινομηθούν ως μηχανοθερμικοί υποδοχείς πόνου (Sneddon, 2003). Ως εκ τούτου, οι

μελέτες σε ελασμοβράγχια απέτυχαν να βρουν αλγοϋποδοχείς, ωστόσο τα τελεόστεα ψάρια φαίνεται να διαθέτουν μη μυελινωμένες ίνες και υποδοχείς πόνου. Ο αρχαιότερος ζωντανός πρόγονος των ψαριών, η λάμπραινα, *Petromyzon marinus*, έχει μόνο μη μυελινωμένες ίνες και οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές βρήκαν αργά προσαρμοζόμενους υποδοχείς που ανταποκρίνονταν στην επιβλαβή θερμότητα και, ως εκ τούτου, ήταν πιθανώς επώδυνη διέγερση (Matthews et al., 1978).

2.3.2 Εγκεφαλικές δομές

Τα ψάρια έχουν τις απαραίτητες περιοχές του εγκεφάλου για να εμφανιστεί η επεξεργασία των επώδυνων ερεθισμάτων (π.χ. γέφυρα, μυελός, θάλαμος), ωστόσο, ένας τομέας συζήτησης είναι ο φλοιός. Τα πιο εξελιγμένα σπονδυλωτά, οι άνθρωποι και τα πρωτεύοντα, έχουν τον πιο ανεπτυγμένο φλοιό με την εξέλιξη του νεοφλοιού (Εικόνα 3). Καθώς κατεβαίνουμε το εξελικτικό δέντρο των σπονδυλωτών, ο φλοιός γίνεται λιγότερο διαφοροποιημένος, αλλά τα ψάρια φαίνεται να έχουν μια υποτυπώδη περιοχή φλοιού. Στα ελασμοβράγχια, αυτή η τελεγκεφαλική περιοχή χαρακτηρίζεται από μεγάλες καλά καθορισμένες κυτταρικές ομάδες με καλά ανεπτυγμένη θαλαμική είσοδο (Northcutt, 1981). Στα τελεόστεα, αυτός ο υποτυπώδης φλοιός είναι καλύτερα ανεπτυγμένος με τις ημισφαιρικές ζώνες να διαθέτουν πολύπλοκες προεξοχές στον διεγκέφαλο και τον μεσεγκέφαλο (Northcutt, 1981). Οι εργασίες σε αυτό το πεδίο είναι ελλιπείς, αλλά θα πρέπει να κατευθύνονται στην κατανόηση των ομοιοτήτων μεταξύ των αμνιωτών και των ψαριών για την κατανόηση της εξελικτικής βάσης της ανάπτυξης του τελεγκεφάλου.

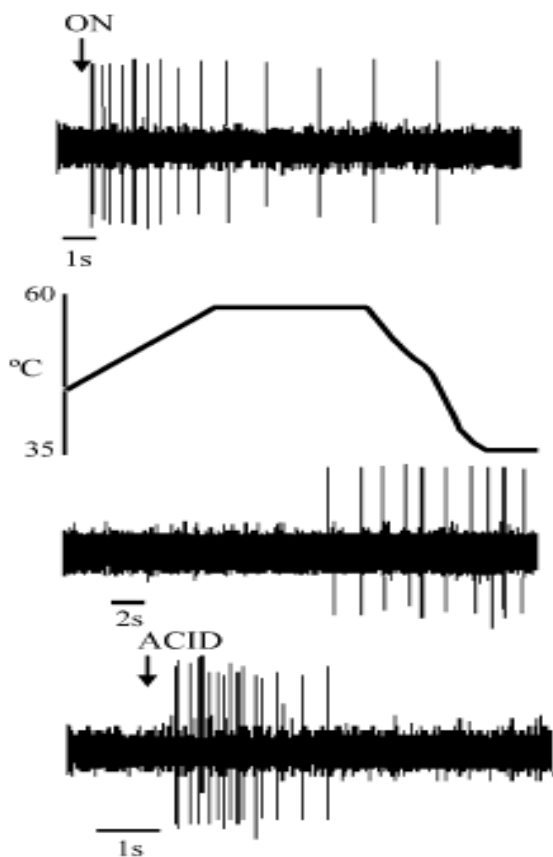


Εικόνα 1. Τομή του κλάδου της άνω γνάθου του τριδύμου νεύρου της ιριδίζουσας πέστροφας που δείχνει την παρουσία ινών Α-δέλτα και C (Sneddon, 2002).

2.3.3 Μονοπάτια προς ανώτερες δομές του εγκεφάλου

Οι κύριες οδοί που εμπλέκονται στην επεξεργασία επώδυνων ερεθισμάτων και τη μετάδοση πληροφοριών στον εγκέφαλο είναι η οδός του τριδύμου που μεταφέρει πληροφορίες από το κεφάλι και η σπονδυλική οδός που μεταφέρει πληροφορίες από το υπόλοιπο σώμα. Και οι δύο οδοί έχουν μελετηθεί εκτενώς σε ομάδες κατώτερων σπονδυλωτών. Σε ένα αγνάθα, η ιχνηλάτηση της υπεροξειδάσης των μυξινών του Ειρηνικού, *Eptatretus stoutii*, έδειξε ότι το τριδύμο νεύρο κατέβηκε μέσω του μυελού στον νωτιαίο μυελό με παρόμοιο τρόπο που παρατηρείται στα ανώτερα σπονδυλωτά (Ronan, 1988). Η οδός του τριδύμου ανέβηκε επίσης στο μεσεγκεφαλικό τέκτο αν και δεν έχουν βρεθεί ακόμη διακριτοί μεσεγκεφαλικοί και κατιόντες πυρήνες του τριδύμου συστήματος σε αυτήν την ομάδα (Ronan, 1988). Αυτό συνέβαινε και στη λάμπραινα (Northcutt, 1979). Ωστόσο, μελέτες σε τελεόστεα έχουν δείξει ότι υπάρχουν διακριτοί πυρήνες, δηλαδή ο μεσεγκεφαλικός πυρήνας και ο κατερχόμενος πυρήνας (κυπρίνος, *Cyprinus carpio* (Luiten, 1975), οξύρρυγχος, *Acipenser oxyrhynchus* (New & Northcutt, 1984)). Η εμφάνιση των δύο τριδύμων πυρήνων στα τελεόστεα αλλά όχι στους προκατόχους των ψαριών υποδηλώνει ότι αυτοί οι πυρήνες εξελίχθηκαν μετά τα άγναθα. Ωστόσο, αυτοί οι πυρήνες υπάρχουν σε ένα ελασμοβράγχιο, το σκυλόψαρο,

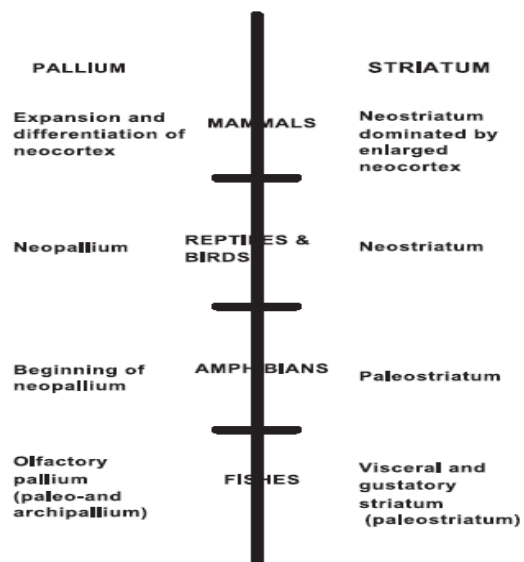
Scyliorhinus canicula (Anadon et al., 2000, Rodriguez-Moldes et al., 1993), και έτσι πρέπει να έχουν εξελιχθεί μεταξύ των αγνάθα και της εμφάνισης των ψαριών. Στον κυπρίνο, το τρίδυμο προεξέχει σαφώς στον θάλαμο όπως συμβαίνει στα ανώτερα σπονδυλωτά, επομένως, αυτή η οδός υπάρχει στα κατώτερα σπονδυλωτά.



Εικόνα 2. Ένας πολυτροπικός αλγοϋποδοχέας που νευρώνεται από το τρίδυμο νεύρο της ιριδίζουσας πέστροφας που ανταποκρίνεται σε μηχανική (A), θερμική (B) και χημική διέγερση (C, 1% οξικό οξύ). Ο υποδοχέας προσαρμόζεται αργά στη μηχανική διέγερση (A, ON υποδηλώνει εφαρμογή ερεθίσματος), έχει θερμικό όριο 58 °C (B) και ανταποκρίνεται στην εφαρμογή μιας σταγόνας οξικού οξέος στο δεκτικό πεδίο (C).

Ο νωτιαίος μυελός των ελασμοβραγχιών έχει μελετηθεί εκτενώς δείχνοντας ότι η φαία ουσία του νωτιαίου μυελού μπορεί να χωριστεί σε επτά ελάσματα (Iwahori et al., 1998). Το πρώτο έλασμα είναι πυκνό σε κύτταρα και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του ραχιαίου κέρατος και αντιστοιχεί στο έλασμα 1 και στη ζελατινώδης ουσία του οπίσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού των θηλαστικών, των πτηνών και των ερπετών. Οι ανερχόμενες ίνες στο νωτιαίο μυελό του καρχαρία τροφού, *Ginglymostoma*

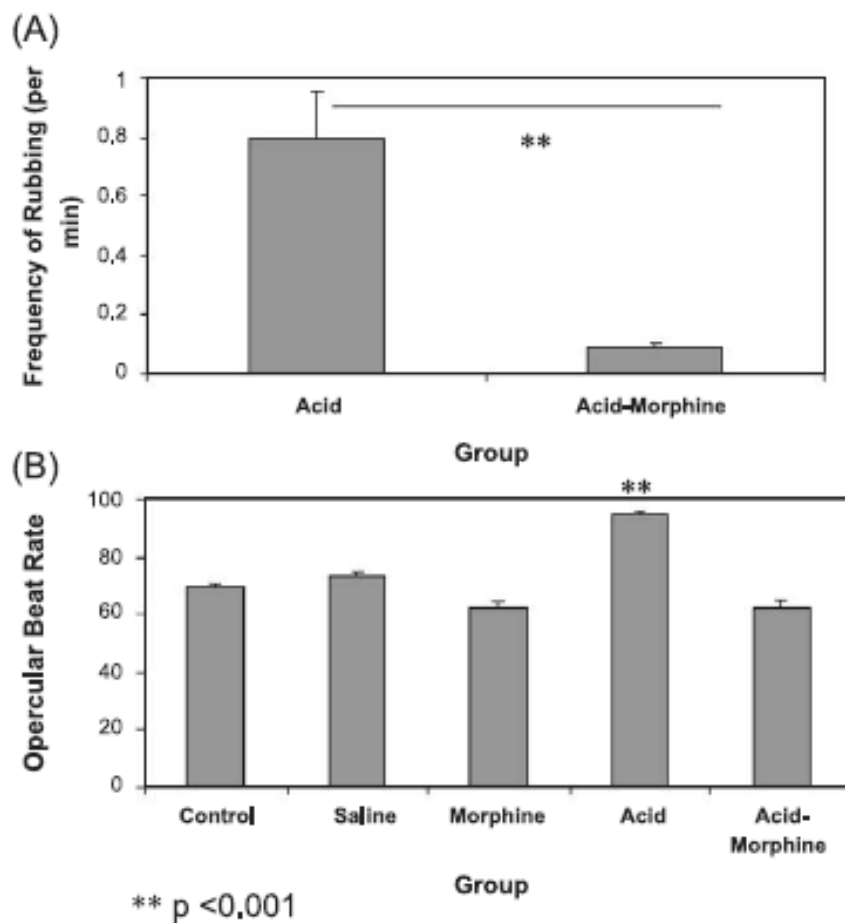
cirratum, φτάνουν στον δικτυωτό σχηματισμό και προβάλλουν επίσης στον ραχιαίο κινητικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού, τον προμήκη μυελό, το κεντρικό εγκεφαλικό στέλεχος, τον παρεγκεφαλιδικό φλοιό, τον παρεγκεφαλιδικό πυρήνα, τον μεσοκολλητικό πυρήνα, τη ραχιαία πλευρά του μεσαίου εγκεφάλου και το θάλαμο (Ebbesson & Hodde, 1981). Εντός του δικτυωτού σχηματισμού δύο ειδών ελασμοβραγχίων, του Καλκανόβατου (*Platyrrhinoidis triseriata*) και του κερασφόρου καρχαρία (*Heterodontus francisci*), υπάρχουν 19 δικτυωτοί πυρήνες με σπονδυλικές προεξοχές που υποδεικνύουν ότι ο δικτυωτός σχηματισμός των ελασμοβραγχίων βρίσκεται πολύπλοκα οργανωμένος σε πολλούς από τους ίδους πυρήνες, όπως βρέθηκαν και σε ανώτερες ομάδες σπονδυλωτών (Cruce et al., 1999). Κατά την εξέταση της κατανομής της ανοσοαντιδραστικότητας στη σεροτονίνη, την ουσία P, τη σωματοστατίνη, το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης, το νευροπεπτίδιο Υ και τη βομβεσινίνη σε μια ποικιλία ειδών ελασμοβραγχίων η κατανομή είναι εντυπωσιακά παρόμοια με τα θηλαστικά. Ως εκ τούτου, οι ομάδες ελασμοβραγχίων έχουν τα ίδια βασικά συστατικά των ανιόντων προεξοχών της σπονδυλικής στήλης (Ebbesson & Hodde, 1981). Αυτό έχει επίσης επιβεβαιωθεί σε μελέτες σε τελεόστεα ψάρια (π.χ. τριγλίδες, *Prionotus carolinus* (Finger, 2000), γατόψαρο, *Ictalurus punctatus* (Goehler & Finger, 1996)).



Εικόνα 3. Ένα υποθετικό γραμμικό εξελικτικό διάγραμμα που δείχνει την ανάπτυξη του φλοιού από τα ψάρια στα θηλαστικά (Northcutt, 1981).

2.3.4 Υποδοχείς οπιοειδών και ουσίες

Η κατοχή υποδοχέων οπιοειδών και ενδογενών οπιοειδών και εγκεφαλικών πιστεύεται ότι είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τον καθορισμό του εάν μπορεί να συμβεί η μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων. Υποδοχείς οπιούχων έχουν βρεθεί στα ψάρια (Buatti & Pasternak, 1981) καθώς και ουσίες που μοιάζουν με εγκεφαλίνη σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου των χρυσόψαρων (Finger 1981, Schulman et al., 1981), γατόψαρων (Finger, 1981), αφρικανικό δίπνοο (Reiner & Northcutt, 1987) και την ιριδίζουσα πέστροφα (Vecino et al., 1991). Εντός του εγκεφάλου, οι εγκεφαλίνες παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο κατανομής με αυτό που παρατηρείται στα ανώτερα σπονδυλωτά (Vecino et al., 1992). Στον νωτιαίο μυελό, η ανοσοαντιδραστικότητα τύπου εγκεφαλίνης είναι πιο πυκνή στο επιφανειακό τμήμα του ελάσματος A που πιστεύεται ότι είναι παρόμοιο με τη νευρογλοιακή ζελατίνη των θηλαστικών (Snow et al., 1996). Ως εκ τούτου, μια συγκρίσιμη κατανομή υποδοχέων και ουσιών οπιούχων βρίσκεται τόσο στα ελασμοβράγχια όσο και στα τελεόστεα που παρατηρούνται σε ανώτερα ζώα.



Εικόνα 4. (A) Η μέση συχνότητα τριψίματος που εκτελείται από ιριδίζουσα πέστροφα στην οποία εγχέεται υποδόρια 0,1% οξικό οξύ και ψάρια που έλαβαν επίσης ένεση με το οξύ αλλά τους χορηγήθηκε μορφίνη. **(B)** Ο μέσος ρυθμός αναπνοής (ρυθμός αερισμού των βραγχίων) των χειριζόμενων μαρτύρων (Control), των ψαριών με ένεση με φυσιολογικό ορό (Saline), των ψαριών ελέγχου που χορηγούνται με μορφίνη (Morphine), των ψαριών με ένεση με οξύ (Acid), καθώς και των ψαριών με ένεση με οξύ που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μορφίνη (Acid– Morphine) (Sneddon, 2003).

2.3.5 Μειωμένη απόκριση σε επώδυνα ερεθίσματα λόγω αναλγητικών

Πολύ λίγα είναι γνωστά για την αναλγησία στα ψάρια, αφού μόλις πρόσφατα βρέθηκε ότι διαθέτουν υποδοχείς πόνου (Sneddon, 2002, Sneddon, 2003). Οι λίγες μελέτες που είναι διαθέσιμες απευθύνονται στις επιπτώσεις της μορφίνης. Οι *in vivo*

αποκρίσεις στην υποδότη ένεση οξικού οξέος ποσοτικοποιήθηκαν στην ιριδίζουσα πέστροφα. Αυτές οι ανεπιθύμητες συμπεριφορικές αντιδράσεις περιελάμβαναν το τρίψιμο της πληγείσας περιοχής που δεν παρατηρήθηκε σε μάρτυρες με ένεση φυσιολογικού ορού (Sneddon, 2003a, Sneddon, 2003b). Όταν χορηγήθηκε μορφίνη σε ψάρια στα οποία έγινε ένεση με οξύ, υπήρξε δραματική μείωση αυτής της συμπεριφοράς τριβής (Εικόνα 4). Εκτός από την επίδραση της συμπεριφοράς, ο ενισχυμένος ρυθμός αναπνοής που παρατηρήθηκε στα ψάρια στα οποία έγινε ένεση με οξύ βελτιώθηκε επίσης από τη μορφίνη. Ως εκ τούτου, η μορφίνη φαίνεται να μειώνει τις αποκρίσεις των τελεόστεων ψαριών σε επώδυνα ερεθίσματα. Αυτό δεν έχει επαναληφθεί σε καμία από τις άλλες ομάδες κατώτερων σπονδυλωτών.

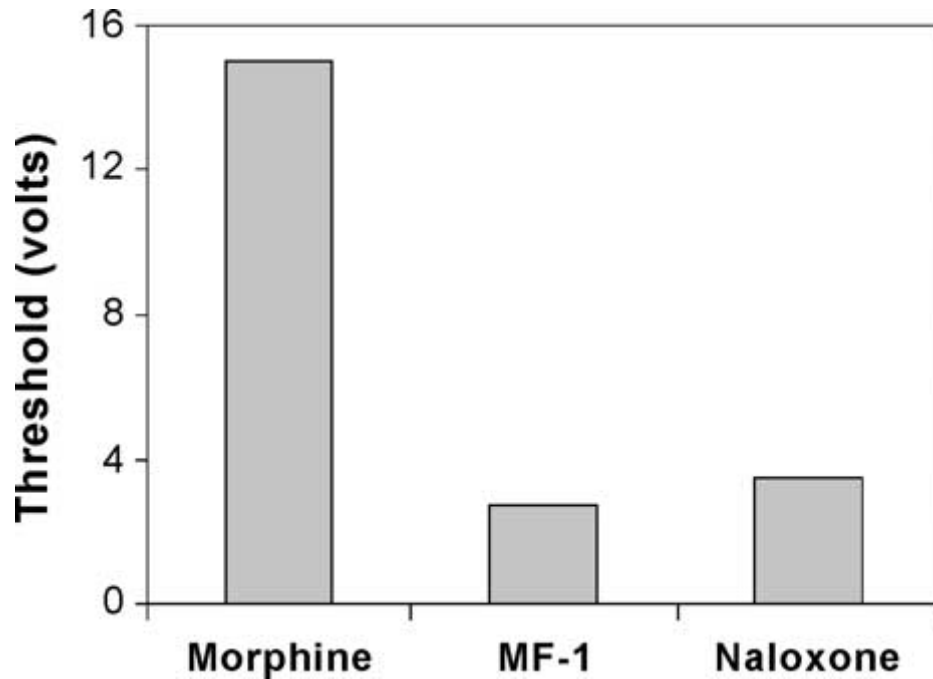
2.3.6 Εκμάθηση αποφυγής

Χρησιμοποιώντας την αρνητική κατάσταση ως υπόδειγμα δοκιμής, οι Ehrensing et al. (1982) χρησιμοποίησαν το χρυσόψαρο για την αποφυγή ηλεκτροπληξίας. Όταν χορηγήθηκε μορφίνη τα ψάρια απέτυχαν να μάθουν και χρειαζόταν υψηλή τάση ηλεκτροπληξίας για να προκληθεί απόκριση ενώ όταν χρησιμοποιήθηκαν οι ανταγωνιστές, MIF-1 και ναλοξόνη, η αποφυγή δημιουργήθηκε σε πολύ χαμηλότερη τάση (Εικόνα 5). Μερικές άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα τελεόστεα ψάρια είναι ικανά να συσχετίσουν ένα ερέθισμα με μια επιβλαβής εμπειρία και να μάθουν να το αποφεύγουν στη συνέχεια (Beukema, 1970a, Beukema, 1970b).

2.3.7 Αναστολή φυσιολογικής συμπεριφοράς

Αυτή είναι μια έμμεση μέτρηση του τρόπου με τον οποίο το ζώο ανταποκρίνεται στην εμπειρία και για να προσπαθήσουμε να μετρήσουμε εάν το ζώο υποφέρει από πόνο και όχι ένα απλό αποκριτικό αντανακλαστικό. Εάν η φυσιολογική συμπεριφορά του ζώου επηρεάζεται αρνητικά και αυτή η εμπειρία είναι επώδυνη για τον άνθρωπο, τότε είναι πιθανό να είναι επώδυνη και για το ζώο. Αυτή είναι μια πολύ υποκειμενική μέθοδος, αλλά επί του παρόντος είναι η κύρια διαθέσιμη μέθοδος για την αξιολόγηση του πόνου των ζώων (Bateson, 1992). Όταν οι ιριδίζουσες πέστροφες έλαβαν υποδότητες ενέσεις οξικού οξέος και δηλητηρίου μέλισσας (αλγητικά), εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό

αναπνοής για περίπου 3 ώρες καθώς και απόδοση ανώμαλων συμπεριφορών και κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου δεν τρέφονταν (Sneddon et al., 2003). Οι μάρτυρες και τα ψάρια στα οποία έγινε ένεση με φυσιολογικό ορό δεν παρουσίασαν αυτές τις ανώμαλες συμπεριφορές και δεν παρουσίασαν τόσο μεγάλη αύξηση στον ρυθμό αναπνοής και άρχισαν να τρέφονται περίπου 80 λεπτά μετά τη θεραπεία. Τα επιβλαβώς διεγερμένα ψάρια συνέχισαν να τρέφονται μόνο όταν είχαν υποχωρήσει οι συμπεριφορικές και φυσιολογικές επιδράσεις του δηλητηρίου της μέλισσας και του οξικού οξέος (180 λεπτά). Περαιτέρω δοκιμές έδειξαν ότι η επιβλαβώς διεγερμένη πέστροφα δεν έδειξε την κατάλληλη απόκριση φόβου σε ένα ερέθισμα που προκαλεί φόβο και προτάθηκε ότι η επιβλαβής εμπειρία κυριάρχησε στην προσοχή και τα ψάρια δεν μπορούσαν να επικεντρώσουν την προσοχή στο ερέθισμα του φόβου (Sneddon et al., 2003). Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως η επιβλαβής εμπειρία που είναι η επιτακτική ανάγκη σε αυτό το παράδειγμα δοκιμής και πολλές κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο άνθρωπος δεν αποδίδει το ίδιο καλά σε άλλες εργασίες όταν πονάει (Kuhajda et al., 2002). Ως εκ τούτου, οι μελέτες στην ιριδίζουσα πέστροφα καταδεικνύουν ότι τα αρνητικά αποτελέσματα μιας επιβλαβούς εμπειρίας είναι περίπλοκα στη φύση, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκεται υψηλότερη επεξεργασία και επομένως υπάρχει η δυνατότητα για αντίληψη του πόνου σε αυτό το τελεόστεο ψάρι.



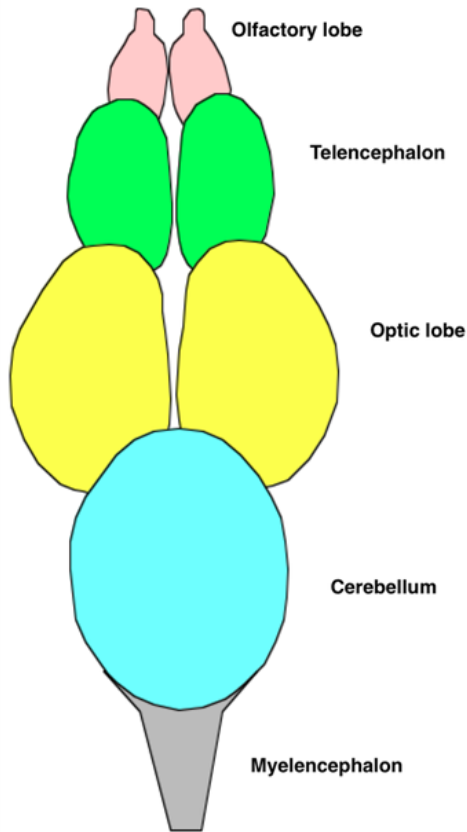
Εικόνα 5. Η τάση ηλεκτροπληξίας που απαιτείται για μια απόκριση αποφυγής στα χρυσόψαρα που χορηγούνται με μορφίνη ή τους ανταγωνιστές οπιοειδών MIF-1 και ναλοξόνη (Ehrensing et al., 1982).

2.4 Νευροανατομικά στοιχεία της αντίληψης πόνου

2.4.1 Επισκόπηση του εγκεφάλου των τελεόστεων

Η ανατομία του εγκεφάλου των τελεόστεων ψαριών ποικίλλει αρκετά, αντανακλώντας τους διαφορετικούς βιότοπους και τρόπους ζωής τους (Butler & Hodos, 1996, Kotrschal et al., 1998, Nieuwenhuys et al., 1998, Wulliman, 1998). Οι περισσότεροι εγκεφαλοι ψαριών είναι πολύ μικροί σε σύγκριση με το συνολικό μέγεθος του σώματος, περίπου το 1/15 της μάζας ενός θηλαστικού ή πουλιού παρόμοιου μεγέθους. Άλλα οστέινα ψάρια, όπως το ελεφαντόψαρο του γλυκού νερού (οικογένεια μορμυριδών), έχουν εξαιρετικά μεγάλο εγκεφαλο σε σύγκριση με το συνολικό μέγεθος του σώματος. Ανεξάρτητα από το μέγεθος του εγκεφάλου, οι εγκεφαλοι των οστειθύων ακολουθούν όλοι ένα βασικό μοντέλο. Στο ραμφοειδές άκρο του ψαριού βρίσκονται οι οσφρητικοί λοβοί, οι οποίοι παρέχουν την αίσθηση της όσφρησης. Ορισμένα είδη οστειθύων έχουν εξαιρετικά μεγάλους οσφρητικούς λοβούς, ιδιαίτερα το γατόψαρο και άλλα αρπακτικά που κυνηγούν με τη μυρωδιά. Πίσω από τους

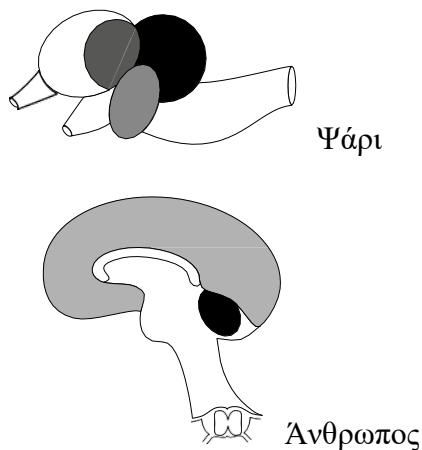
οσφρητικούς λοβούς βρίσκεται ο τελεγκέφαλος, ο οποίος είναι ισοδύναμος με τον εγκέφαλο στα περισσότερα άλλα σπονδυλωτά. Μαζί, οι οσφρητικοί λοβοί και ο τελεγκέφαλος αποτελούν τον πρόσθιο εγκέφαλο των οστειχθύνων. Ο πρόσθιος εγκέφαλος συνδέεται με τον ενδιάμεσο εγκέφαλο μέσω του διεγκέφαλου, μιας δομής που εξισορροπεί τις ορμόνες. Ο διεγκέφαλος συνδέεται με το επίφυσο σώμα, το οποίο ανιχνεύει το φως και το σκοτάδι και συντονίζει τις χρωματικές αλλαγές. Ο ίδιος ο μεσαίος εγκέφαλος (μεσεγκέφαλος) αποτελείται από δύο οπτικούς λοβούς, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα καλά ανεπτυγμένοι σε οστειχθύνες που κυνηγούν με την όραση. Στο ουραίο, ή πίσω άκρο του εγκεφάλου βρίσκεται ο οπίσθιος εγκέφαλος, ή μετεγκέφαλος. Ο οπίσθιος εγκέφαλος περιέχει την παρεγκεφαλίδα, το τμήμα του εγκεφάλου που ελέγχει την κίνηση και την ισορροπία στους ανθρώπους (Εικόνα 6). Στους οστειχθύνες η παρεγκεφαλίδα έχει παρόμοια λειτουργία, συντονίζοντας την ισορροπία και ελέγχει τις κινήσεις που βοηθούν τα ψάρια να κολυπήσουν. Σε πολλά ψάρια, η παρεγκεφαλίδα είναι το μεγαλύτερο μέρος του εγκεφάλου. Ο οπίσθιος εγκέφαλος συνδέεται με το νωτιαίο μυελό μέσω του μυελεγκεφάλου, ο οποίος λειτουργεί στην ωσμορύθμιση (ισορροπία του νερού) και την αναπνοή.



Εικόνα 6. Το βασικό πλάνο του εγκεφάλου των οστειχθύων

Ο τελεγκέφαλος παρουσιάζει πολλές αμοιβαίες συνδέσεις με τα άλλα μέρη του εγκεφάλου. Τα προηγμένα τελεόστεα ψάρια, όπως τα *Percidae*, τείνουν να διευρύνουν τον μεσαίο εγκέφαλο και να αναπτύξουν μια εμφανής οπτική στέγη προκειμένου να επεξεργαστεί τις αισθητηριακές πληροφορίες από το οπτικό σύστημα καθώς και από το σύστημα πλευρικής γραμμής, το οποίο παρέχει στο ψάρι λεπτομερείς πληροφορίες για το τρισδιάστατο περιβάλλον του. Ο οπίσθιος εγκέφαλος περιέχει έναν προεξέχοντα δικτυωτό σχηματισμό που περιλαμβάνει γιγάντια κύτταρα Müller και Mauthner για πολύ γρήγορη αποφυγή και συμπεριφορές διαφυγής. Το μέγεθος του εγκεφάλου των ψαριών σε σχέση με το μέγεθος του σώματος είναι πολύ μικρότερο από ό,τι συμβαίνει στον ανθρώπινο εγκέφαλο (Huntingford et al., 2006). Υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ του εγκεφάλου θηλαστικών και ψαριών σε σχέση με τον πρόσθιο εγκέφαλο, ιδιαίτερα τον τελεγκέφαλο. Η διαφορά εκφράζεται τόσο σε σχέση με το συνολικό μέγεθος του πρόσθιου εγκεφάλου όσο και σε σχέση με το επιφανειακό στρώμα του, το μανδύα ή τον φλοιό. Γενικά, η εξέλιξη του εγκεφάλου στα σπονδυλωτά δεν πρέπει να θεωρείται ως μια γραμμική εξέλιξη, από τον πιο απλό εγκέφαλο στα ψάρια μέχρι τον

πιο προηγμένο εγκέφαλο στα θηλαστικά (Εικόνα 7). Αντίθετα, η εξέλιξη του εγκεφάλου στα σπονδυλωτά έχει ακολουθήσει αποκλίνουσες διαδρομές, με μία διαδρομή να κινείται προς τα οστείνα ψάρια, μία προς τα πουλιά και μία προς τα θηλαστικά.



- Νεοφλοιός
- Οπτικός λοβός
- Εγκέφαλος
- Παρεγκεφαλίδα

Εικόνα 7. Σύγκριση της ανατομίας του εγκεφάλου σε κατηγορίες σπονδυλωτών. Ενώ στον εγκέφαλο των ψαριών κυριαρχεί ο τελεγκέφαλος, ο οπτικός λοβός και η παρεγκεφαλίδα, ο ανθρώπινος εγκέφαλος κυριαρχείται από τον νεοφλοιό.

2.4.2 Νευροανατομικοί συσχετισμοί

Η αντίληψη του πόνου στον άνθρωπο έχει τον νευρικό της συσχετισμό στη μήτρα του πόνου που περιλαμβάνει το εγκεφαλικό στέλεχος, τον θάλαμο, τις υποφλοιώδεις καθώς και τις νεοφλοιώδεις περιοχές. Ενώ ο νεοφλοιός απουσιάζει στα τελεόστεα ψάρια, υπάρχουν οι περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους και ο θάλαμος. Η κατάσταση είναι λιγότερο σαφής σε σχέση με τα υποφλοιώδη συστατικά της μήτρας του πόνου που έχουν την προέλευσή τους στον τελεγκέφαλο, όπως η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος. Προηγούμενες θεωρίες για την εξέλιξη του εγκεφάλου στα σπονδυλωτά υποστήριζαν ότι νέες περιοχές προέκυψαν σταδιακά από προϋπάρχουσες περιοχές (Kardong, 2006). Σε αυτή τη γραμμή, ο νεοφλοιός κατανοήθηκε ως μια «νεοδομή» η

οποία εξελικτικά αναπτύχθηκε από μια μανδουακή αρχιτεκτονική. Εν τω μεταξύ, καθιερώνεται μια αναθεωρημένη άποψη της εγκεφαλικής εξέλιξης στα σπονδυλωτά, η οποία κατανοεί την εξέλιξη του πρόσθιου εγκεφάλου των σπονδυλωτών όχι ως μια σταδιακή, γραμμική διαδικασία, αλλά ως μια αποκλίνουσα διαφοροποίηση από μια κοινή προγονική ανατομία. Αυτή η βασική δομή του εγκεφάλου των σπονδυλωτών περιλαμβάνει ένα μανδύα με μεσαία, ραχιαία και πλάγια τμήματα και έναν υπομανδύα με ραβδωτό σώμα, διάφραγμα και ωχρά (Northcutt, 1995, Kardong, 2006, Medina & Abellan, 2009). Στα τελεόστεα, ο μανδύας (αλλά όχι ο υπομανδύας) ανατρέπεται και ταλαντεύεται προς τα έξω με αναδιάταξη των μανδουακών περιοχών (Northcutt, 2008), ενώ σε όλα τα άλλα σπονδυλωτά γίνεται ανεστραμμένο, με το μεσαίο μανδύα και το διάφραγμα να κυλίνονται προς τα μέσα και τα πλευρικά και ραχιαία τοιχώματα που αναστρέφονται προς τα έξω. Σε σύγκριση με τους εγκεφάλους των άλλων σπονδυλωτών, ο μανδύας των ψαριών, επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι μέσα προς τα έξω.

Ενώ αρχικά θεωρήθηκε ότι ο πρωταρχικός ρόλος του εγκεφάλου των τελεόστεων είναι η επεξεργασία της οσφρητικής εισροής, είναι πλέον σαφές ότι η λειτουργία του ξεπερνά σαφώς αυτή την πτυχή. Ο εγκέφαλος έχει εξελιχθεί σε μια εξαιρετικά διαφοροποιημένη δομή που είναι απαραίτητη για την επεξεργασία ποικίλων αισθητηριακών πληροφοριών και πιθανώς επίσης συναισθηματικών πληροφοριών. Η έρευνα των τελευταίων ετών έχει δείξει αξιοσημείωτες γνωστικές, μαθησιακές και μνημονευτικές ικανότητες των ψαριών, και είναι ο εγκέφαλος που φαίνεται να είναι ο κύριος νευρικός συσχετισμός με αυτές τις ικανότητες (Chandroo et al., 2004a, Braithwaite, 2010). Μανδουακές και υπο-μανδουακές περιοχές του εγκεφάλου των τελεόστεων εμφανίζουν νευρικές συνδέσεις με άλλες περιοχές του εγκεφάλου που μοιάζουν με αυτές των ανώτερων σπονδυλωτών (Butler & Hodos, 1996, Nieuwenhuys et al., 1998) και εμπλέκονται στην επεξεργασία σωματοαισθητηριακών, γευστικών, οπτικών, ακουστικών και άλλων αισθητηριακών μορφών. Διαμεσολαβούν σύνθετες συμπεριφορές και λειτουργίες ενσωμάτωσης, όπως η μάθηση αποφυγής, η χωρική μάθηση, η γενική διέγερση και η κοινωνική συμπεριφορά, και είναι κεντρικά για τα κίνητρα και τη συναισθηματική μάθηση, καθώς και για τη μνήμη. Ο πλευρικός μανδύας, για παράδειγμα, είναι ζωτικής σημασίας για τη χωρική μάθηση, ενώ ο μεσαίος μανδύας είναι απαραίτητος για τη συναισθηματική μάθηση και τις σχετικές

διαδικασίες, όπως η εκμάθηση αποφυγής (Portavella et al., 2004, Broglio et al., 2005, Vargas et al., 2009). Τα ψάρια με πλευρικές βλάβες του μανδύα παρουσιάζουν σοβαρά και μόνιμα ελλείμματα στην αναγνώριση ενός οικείου τόπου, στην εύρεση και εφαρμογή νέων διαδρομών ή στην απομνημόνευση γνωστών διαδρομών (Rodriguez et al., 2002, Broglio et al., 2010, Duran et al., 2010). Η χωρική μάθηση έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη δραστηριότητα του πλευρικού μανδύα και η αφαίρεση αυτής της περιοχής του εγκεφάλου μειώνει σημαντικά την ικανότητα χωρικής μάθησης (Rodriguez et al., 2002). Η χειρουργική αφαίρεση άλλων μανδυακών περιοχών παρέμεινε χωρίς επίδραση στη χωρική μάθηση και στη μνήμη των ψαριών (Broglio et al., 2010). Οι βλάβες στον μεσαίο μανδύα έχουν επίδραση στη συναισθηματική μάθηση των ψαριών. Για παράδειγμα, τόσο οι Broglio et al. (2005) όσο και οι Portavella et al. (2002) παρατήρησαν ότι η μεσαία αλλοίωση βλάπτει την απόκτηση και τη διατήρηση της εξαρτημένης απόκρισης αποφυγής σε πειράματα εκμάθησης. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι ο πλευρικός και ο μεσαίος μανδύας έχουν παρόμοιες εμπλοκές στη συναισθηματική και χωρική εκμάθηση, όπως ο υπόκαμπος και η αμυγδαλή των τετράποδων. Έχει επίσης προταθεί ότι ο ραχιαίος μανδύας είναι ομόλογος με τον νεοφλοιό των θηλαστικών, για παράδειγμα, λόγω των νευρικών συνδέσεων με άλλες περιοχές του εγκεφάλου που είναι παρόμοιες με τα τετράποδα (Echteler & Saidel, 1981), ή λόγω ομολογιών σε γενετικούς δείκτες μεταξύ του ραχιαίου μανδύα και του νεοφλοιού των θηλαστικών (Wullimann & Müller, 2004). Συνολικά, ωστόσο, τα διαθέσιμα στοιχεία για ένα ομόλογο νεοφλοιού στα ψάρια παραμένουν ανεπαρκή.

2.4.3 Στοιχεία νευροφυσιολογίας

Νευροαπεικόνιση και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν εφαρμοστεί εντατικά σε μελέτες με θηλαστικά για την αποκάλυψη αλλαγών στη λειτουργική κατάσταση του εγκεφάλου μετά από διέγερση για απόκριση στον πόνο. Αυτός ο τύπος μελετών έδειξε, για παράδειγμα, αυξημένη νευρωνική δραστηριότητα σε περιοχές όπως ο πρόσθιος φλοιός όταν εθελοντές υποβλήθηκαν σε δυσάρεστα επιβλαβή ερεθίσματα όπως το τονωτικό κρυολόγημα (Kwan et al., 2000). Συγκρίσιμες μελέτες με ψάρια είναι πολύ σπάνιες έως απύσες, πιθανώς όχι μόνο λόγω τεχνικών δυσκολιών αλλά και λόγω

δυσκολιών στην ερμηνεία. Εάν, για παράδειγμα, παρατηρηθεί μια ηλεκτροφυσιολογική απόκριση σε μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου του ψαριού, πώς μπορεί να αποδειχθεί ότι αυτό δεν αντιπροσωπεύει ανίχνευση επώδυνου ερεθίσματος αλλά αντίληψη πόνου; Οι Dunlop και Laming (2005) υπέβαλαν την πέστροφα και το χρυσόψαρο σε μηχανοδεκτικά ερεθίσματα και κατέγραψαν ηλεκτροφυσιολογικές αποκρίσεις στον εγκέφαλο. Η δραστηριότητα βρέθηκε όχι μόνο στις περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους και του νωτιαίου μυελού, αλλά και στον πρόσθιο εγκέφαλο, δηλαδή στην περιοχή του εγκεφάλου όπου βρίσκονται τα ανώτερα γνωστικά κέντρα. Επίσης οι Nordgreen et al. (2007) διαπίστωσαν ότι η ηλεκτρική διέγερση της ουράς του σολομού του Ατλαντικού, *Salmo salar*, οδήγησε σε νευρωνική δραστηριότητα στον τελεγκέφαλο. Ομοίως, οι Reilly et al. (2008) που μελέτησαν την έκφραση γονιδίων σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου ψαριών που εκτέθηκαν σε ερεθίσματα παρατήρησαν αποκρίσεις επαγωγής γονιδίων στον τελεγκέφαλο. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η νευρική απόκριση των ψαριών σε επώδυνα ερεθίσματα δεν περιορίζεται στα κατώτερα εγκεφαλικά κέντρα του μεσαίου και οπίσθιου εγκεφάλου, αλλά επεκτείνεται στον τελεγκέφαλο. Δεδομένου ότι ο τελεγκέφαλος κατέχει κεντρικό ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη, η επεξεργασία του πόνου σε αυτό το τμήμα του εγκεφάλου μπορεί να υποδηλώνει, αν και δεν έχει ακόμη αποδειχθεί, ότι η νευροφυσιολογική ανταπόκριση των ψαριών στα ερεθιστικά σήματα υπερβαίνει μια απλή αντανάκλαστική απόκριση αλλά μπορεί να επεξεργάζεται τα εξωτερικά ερεθίσματα σε γνωστικό και συναισθηματικό επίπεδο (Nordgreen et al., 2007). Ένα πολλά υποσχόμενο βήμα έγινε από τους Nordgreen et al. (2007) που αντιμετώπισαν τον σολομό με ηλεκτρικά ερεθίσματα διαφορετικής έντασης, τα οποία θεώρησαν ως υποθετικά μη επιβλαβή (χαμηλής έντασης) και πιθανώς επιβλαβή (υψηλής έντασης). Οι δύο θεραπείες προκάλεσαν σημαντικά διαφορετικά ηλεκτρικά δυναμικά στον τελεγκέφαλο. Ενώ αυτό το εύρημα δείχνει ότι ο σολομός κάνει διάκριση μεταξύ των υποτιθέμενων επιβλαβών και των υποθετικά μη επιβλαβών ερεθισμάτων, παραμένει ασαφές τι σημαίνει αυτή η διαφορά σε σχέση με την αντίληψη του πόνου.

Ο εγκέφαλος των ψαριών διαθέτει νευροδιαβιβαστές, όπως για παράδειγμα η ντοπαμίνη, οι οποίοι στον άνθρωπο εμπλέκονται σε συναισθηματικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου του πόνου. Η ντοπαμίνη έχει σημαντικές λειτουργίες στα κίνητρα και στη συμπεριφορά ανταμοιβής. Είναι ενδιαφέρον ότι η χορήγηση

ντοπαμινεργικών αγωνιστών όπως η αμφεταμίνη προκαλεί συμπεριφορά ανταμοιβής όχι μόνο στα θηλαστικά αλλά και στα ψάρια (Chandroo et al., 2004a), υποδεικνύοντας πιθανώς κάποια ικανότητα των ψαριών να βιώνουν συναισθήματα. Επίσης η ουσία P, η οποία στα θηλαστικά εμπλέκεται στη μεσολάβηση του πόνου καθώς και σε διαδικασίες ανταμοιβής, επηρεάζει τη συμπεριφορά ανταμοιβής των ψαριών (Mattioli et al. 1995). Μεγάλη έμφαση στη μελέτη των νευροφυσιολογικών πτυχών της ανίχνευσης επώδυνων ερεθισμάτων και του πόνου στα ψάρια δόθηκε στο ερώτημα εάν τα ψάρια διαθέτουν ενδογενές αναλγητικό σύστημα. Τα σπονδυλωτά μπορούν να ελέγξουν ενδογενώς τη μετάδοση των παθογόνων σημάτων και να μειώσουν την αίσθηση του πόνου μέσω πεπτιδίων οπιούχων, εγκεφαλινών και των αντίστοιχων υποδοχέων οπιούχων. Υπάρχουν καλές ενδείξεις ότι τα ψάρια, όπως και άλλα σπονδυλωτά, διαθέτουν υποδοχείς οπιούχων, ενδογενή οπιοειδή και εγκεφαλίνες. Τα πρώτα στοιχεία για την παρουσία ενδογενών οπιοειδών και υποδοχέων οπιοειδών έγιναν διαθέσιμα στα τέλη της δεκαετίας του 1980 (Vallarino, 1985, Rosenblum & Callard, 1988, McDonald & Dores, 1991). Εν τω μεταξύ, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα ψάρια διαθέτουν και τους τέσσερις κύριους τύπους υποδοχέων οπιοειδών (δέλτα, κάπα, mu και NOP) που βρίσκονται σε σπονδυλωτά (Weber, 2011), ότι η πρωτεϊνική δομή των υποδοχέων οπιούχων των ιχθύων είναι πολύ παρόμοια με αυτή των υποδοχέων οπιοειδών των θηλαστικών, και ότι η κατανομή των ενδογενών οπιοειδών και εγκεφαλινών στον εγκέφαλο των ψαριών είναι παρόμοια με αυτή στους εγκεφάλους των θηλαστικών (EFSA, 2009). Είναι σημαντικό ότι η έκφραση των υποδοχέων οπιούχων στον εγκέφαλο των ψαριών δεν περιορίζεται στο στέλεχος του εγκεφάλου, αλλά, σε σύγκριση με τα θηλαστικά, βρίσκονται επίσης στον τελεγκέφαλο των ψαριών, δηλαδή μπορούν δυναμικά να παρεμβαίνουν στην επεξεργασία υψηλότερου επιπέδου αισθητηριακών και συναισθηματικών πληροφοριών (Gonzalez-Nunez & Rodriguez, 2009). Μελέτες συμπεριφοράς αποκάλυψαν ότι το σύστημα οπιοειδών στα ψάρια έχει πράγματι αναλγητική λειτουργία, καθώς η χορήγηση αναλγητικών ουσιών όπως η μορφίνη ή ανταγωνιστών οπιούχων όπως η ναλοξόνη στα ψάρια έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη αποκριτική συμπεριφορά σε επώδυνα ερεθίσματα (Ehrensing & Michell, 1982, Chervova, 1997, Sneddon, 2003a,b, Nordgreen et al., 2009, Mettam et al., 2011). Οι μοριακές, βιοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των υποδοχέων οπιοειδών των ψαριών είναι θεμελιωδώς παρόμοιες με τους αντίστοιχους των θηλαστικών. Κατά

συνέπεια, είδη ψαριών όπως το ψάρι ζέβρα χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί πρότυπο για τη μελέτη της δραστηριότητας των οπιοειδών και για την ανάπτυξη νέων αναλγητικών και ψυχοδραστικών φαρμάκων για τον άνθρωπο (Gonzalez-Nunez & Rodriguez, 2009). Και πάλι, ωστόσο, η παρουσία του συστήματος οπιοειδών στα ψάρια δεν είναι ακόμη επαρκής για να συμπεράνουμε ότι υπάρχει αντίληψη πόνου. Αυτό το σύστημα μπορεί απλώς να χρησιμεύσει για την καταστολή των παθολόγων αποκρίσεων, αν και μπορούμε να αναρωτηθούμε εάν αυτό θα απαιτούσε ένα φαινομενικά επεξεργασμένο αναλγητικό σύστημα.

2.4.4 Γνωστική λειτουργία των ψαριών

Για να μπορέσει να ανταποκριθεί με ευέλικτο τρόπο, το ζώο χρειάζεται προηγμένες δυνατότητες για να επεξεργαστεί τις πληροφορίες, να τις απομνημονεύσει, να τις συνδέσει με άλλες πληροφορίες και με το συναίσθημα και να συναγάγει λογικές αποφάσεις από αυτές τις γνωστικές διαδικασίες. Οι μελέτες συμπεριφοράς μπορούν να παρέχουν εικόνα για τις ψυχικές καταστάσεις των ζώων, δηλαδή την ικανότητά τους να επεξεργάζονται τις εισροές πληροφοριών και να τις σχολιάζουν συναισθηματικά (Bateson, 1991, Rose, 2002, Chandroo, 2004a, b, Broom, 2007, Cottee, 2012). Ο τομέας της έρευνας συμπεριφοράς που ασχολείται με το μυαλό των ζώων ορίζεται επίσης ως γνωστική ηθολογία (Bekoff, 2007, Wild, 2012).

Όσον αφορά τις γνωστικές ικανότητες των ψαριών, η συμβατική σοφία απεικονίζει τα ψάρια ως απλούς οργανισμούς που καθοδηγούνται από το ένστικτο με «μνήμη τριών δευτερολέπτων» (Laland et al., 2003, Salas et al., 2006, Braithwaite, 2010), επιδεικνύοντας κυρίως αντανακλαστική συμπεριφορά και μικρές γνωστικές ικανότητες. Πρόσφατη έρευνα αμφισβήτησε αυτή την άποψη και έχει δείξει βαθιές ικανότητες των ψαριών για γνωστικές διαδικασίες, για παράδειγμα, τα ψάρια είναι σε θέση να δημιουργήσουν νοητικές αναπαραστάσεις των κοινωνικών τους αλληλεπιδράσεων και του περιβάλλοντός τους (Bshary et al., 2002, Sloman et al., 2006). Είναι αδιαμφισβήτητο το γεγονός ότι τα ψάρια είναι ικανά για απλές μορφές μάθησης όπως η συνειρμική μάθηση. Αυτό αντιπροσωπεύει την κλασική προετοιμασία και λειτουργική μάθηση «Pawlow», δηλαδή μια οποιασδήποτε μορφής μάθηση κατά την οποία μια απάντηση συνδέεται (μέσω ανταμοιβής ή τιμωρίας) με ένα ερέθισμα.

Αυτή η μορφή μάθησης αντιπροσωπεύει μια αντανακλαστική συμπεριφορά που δεν απαιτεί υψηλότερες γνωστικές ικανότητες. Αντίστοιχα, η συνειρμική μάθηση είναι ήδη παρούσα σε ζώα με σχετικά απλά νευρικά συστήματα όπως το μαλάκιο *Aplysia* (Lorenzetti et al., 2006). Έτσι, η παρουσία της συνειρμικής μάθησης δεν υποδηλώνει ακόμη την παρουσία υψηλότερων γνωστικών ικανοτήτων στα ψάρια. Ωστόσο, τα ψάρια εκτελούν διαδικασίες γνωστικής μάθησης που ξεπερνούν σαφώς τη συνειρμική μάθηση (Bshary et al., 2002, Laland et al., 2003, Warburton, 2003, Braithwaite, 2006). Το εξελικτικό πλεονέκτημα των διαφοροποιημένων γνωστικών ικανοτήτων είναι ότι επιτρέπουν στα ζώα να λαμβάνουν αποφάσεις και να είναι σε θέση να ανταποκρίνονται σε νέες καταστάσεις με ευέλικτο και όχι στερεότυπο τρόπο (Kotrschal & Taborsky, 2010). Τα ψάρια μπορούν να αναγνωρίσουν χωρικά μοτίβα και πολύπλοκες χρονικές ακολουθίες, απομνημονεύουν εμπειρίες, επιδεικνύουν ιδιαίτερα ανεπτυγμένες κοινωνικές συμπεριφορές και μπορούν να μάθουν από εμπειρίες προκειμένου να προσαρμόσουν τη συμπεριφορά τους σε νέες καταστάσεις. Σήμερα, τα ψάρια (ιδιαίτερα είδη όπως το ψάρι ζέβρα που προσφέρουν τη δυνατότητα γενετικών ελέγχων σε συνδυασμό με μελέτες συμπεριφοράς) προωθούνται ως μοντέλα νευροσυμπεριφορικής έρευνας σε θηλαστικά, λόγω των πολλών συμπεριφορικών και γνωστικών ομοιοτήτων τους με τα τρωκτικά (Egan et al., 2009, Sison & Gerlai, 2010, Stewart et al., 2010, Wong et al., 2010, Gaikwad et al., 2011).

Εκτός από τις γνωστικές ικανότητες για την επεξεργασία κοινωνικών πληροφοριών, τα ψάρια διαθέτουν καλά ανεπτυγμένες γνωστικές ικανότητες να αντιμετωπίζουν συμπεριφορικά το περιβάλλον τους και τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Ένα παράδειγμα παρέχεται από την ικανότητά τους να μαθαίνουν και να κωδικοποιούν χωρικές πληροφορίες για το περιβάλλον τους σε χωρικούς χάρτες. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο προσανατολισμός των ψαριών, για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης, ήταν κατανοητός ως μια πρωτίστως καθορισμένη γενετικά συμπεριφορά. Ωστόσο, καθώς το φυσικό περιβάλλον μπορεί να αλλάξει, είναι πλεονεκτικό οι οργανισμοί να είναι πιο ευέλικτοι και να έχουν την ικανότητα να μαθαίνουν και να επεξεργάζονται χωρικές πληροφορίες. Στην πραγματικότητα, τα ψάρια μπορούν να απομνημονεύσουν πληροφορίες για το περιβάλλον τους και μπορούν να κωδικοποιήσουν νοητικούς χάρτες σχετικά με τις χωρικές σχέσεις μεταξύ πολλαπλών ενδείξεων, ορόσημων ή αισθητηριακών χαρακτηριστικών. Αυτό δίνει τη

δυνατότητα στο υποκείμενο να εντοπίσει ένα αντικείμενο ή τη δική του θέση (Salas et al., 2006). Ένα ενδεικτικό πείραμα για να καταδείξει την ικανότητα των ψαριών να κωδικοποιούν χωρικούς χάρτες πραγματοποιήθηκε από τον Burt de Perrera (2004a) χρησιμοποιώντας το μεξικάνικο ψάρι των σπηλαίων, *Asytanax fasciatus*. Αυτό το είδος είναι τυφλό αλλά αναγνωρίζει φυσικές δομές στο περιβάλλον του μέσω αλλαγών στο πεδίο ροής γύρω από το σώμα του. Η ανίχνευση του πεδίου ροής γίνεται μέσω των νευροϊστών στο σύστημα πλευρικής γραμμής. Τα ψάρια των σπηλαίων κολυμπούν πιο γρήγορα όταν έρχονται αντιμέτωπα με άγνωστα ορόσημα στο περιβάλλον τους, αλλά τελικά εξοικειώνονται με τις χωρικές συνθήκες του περιβάλλοντος και στη συνέχεια μειώνουν την ταχύτητα κολύμβησης. Όταν τα ψάρια των σπηλαίων, αφού έχουν εξοικειωθεί σε ένα δεδομένο χωρικό περιβάλλον, στη συνέχεια έρχονται αντιμέτωπα με μια αλλαγή σε αυτή τη χωρική διάταξη, αυξάνουν την ταχύτητα κολύμβησης (Burt de Perrera, 2004a). Αυτή η συμπεριφορά δείχνει ότι το ψάρι απομνημόνευσε το αρχικό χωρικό περιβάλλον και ήταν σε θέση να αναγνωρίσει την αλλοίωσή του. Η ικανότητα κωδικοποίησης χωρικών χαρτών έχει αποδειχθεί και για πολλά άλλα είδη ψαριών, για παράδειγμα, τα ψάρια των κοραλλιογενών υφάλων, όπως οι Χαιτοδοντίδες, απομνημονεύουν τα μονοπάτια που συνδέουν τη τροφή τους με την περιοχή κατοικίας τους. Όταν τα ορόσημα σε αυτό το μονοπάτι εκτοπίζονται, τα ψάρια σταματούν να κολυμπούν και αναζητούν το ορόσημο που λείπει (Reese, 1989).

Οι γνωστικές λειτουργίες των ψαριών μπορούν να τροποποιηθούν από το άγχος, με τον ίδιο τρόπο που συμβαίνει και στον άνθρωπο. Αυτό μπορεί να απεικονιστεί στο παράδειγμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ άγχους και μνήμης. Για τους ανθρώπους είναι καλά αποδεδειγμένο ότι το άγχος επηρεάζει τις γνωστικές λειτουργίες και μπορεί να βλάψει τη μάθηση και τη μνήμη. Αυτό είναι παράλληλο με τα ψάρια, όπως φαίνεται από τους Gaikwad et al. (2011), οι οποίοι εκπαίδευσαν ψάρια ζέβρες σε έναν υδρόβιο λαβύρινθο για 14 ημέρες χρησιμοποιώντας τροφή ως ανταμοιβή. Πριν από την τελική δοκιμή, τα ψάρια υπέστησαν έντονο στρες από έναν από τους δύο οικολογικά σχετικούς παράγοντες άγχους, οι οποίοι ήταν η έκθεση σε ένα είδος ψαριού θηρευτή ή η έκθεση σε μια φερομόνη. Το οξύ στρες μείωσε σημαντικά χωρική μνήμη των ζεβρόψαρων στο τεστ λαβυρίνθου. Αυτή η παρατήρηση με ψάρια ανταποκρίνεται πλήρως στα αποτελέσματα από μελέτες λαβυρίνθου με θηλαστικά. Το πιο σημαντικό μήνυμα από τις μελέτες συμπεριφοράς σε σχέση με το ζήτημα της αντίληψης του πόνου είναι ότι οι

γνωστικές ικανότητες των ψαριών ξεπερνούν σαφώς το επίπεδο της αντανεκλαστικής, αμετάβλητης ή συνειρμικής μάθησης, αλλά έχουν υψηλότερες γνωστικές ικανότητες όπως η αναγνώριση και η μνήμη των ατόμων, η αναγνώριση συνεργατών, η παρατηρητική και κοινωνική μάθηση, η πολιτιστική μετάδοση και, κυρίως, οι λογικοί συλλογισμοί.

Συνολικά, τα παραδείγματα που συζητήθηκαν παραπάνω παρέχουν σαφείς αποδείξεις ότι τα ψάρια διαθέτουν σημαντικές γνωστικές ικανότητες οι οποίες από πολλές απόψεις είναι παράλληλες με αυτές των θηλαστικών. Αυτό συμβαίνει παρά την απουσία του νεοφλοιού, κάτι που μας επαναφέρει στο ερώτημα της νευρικής βάσης των γνωστικών ικανοτήτων στα ψάρια. Στα θηλαστικά, γνωστικά χαρακτηριστικά υψηλής τάξης, όπως χωρικές μνήμες και χάρτες, που απαιτούν πολύπλοκη συσχετιστική επεξεργασία, λαμβάνουν χώρα στον ιππόκαμπο και στον νεοφλοιό. Τα ψάρια εκτελούν πολύπλοκες χωρικές εργασίες με τρόπο συγκρίσιμο με τα θηλαστικά, αν και η νευροανατομία τους είναι διαφορετική από τα θηλαστικά. Ενώ έχουν ομόλογο του ιππόκαμπου (τον ραχιαίο μανδύα του εγκεφάλου των ψαριών ο οποίος θεωρείται ομόλογο με τον τετράποδο ιππόκαμπο), τους λείπει νεοφλοιός. Προφανώς, τα ψάρια χρησιμοποιούν εγκεφαλικές δομές εκτός του νεοφλοιού για να εκτελέσουν γνωστικές λειτουργίες οι οποίες στα θηλαστικά βασίζονται τουλάχιστον εν μέρει στον νεοφλοιό. Όλα τα προαναφερθέντα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ψάρια διαθέτουν σαφείς γνωστικές ικανότητες. Αυτό είναι ένα σημαντικό προαπαιτούμενο για να μπορέσουμε να μετατρέψουμε τις αποκριτικές πληροφορίες σε πόνο (Grandin & Deesing, 2003). Ωστόσο, δεν σημαίνει αυτόματα ότι όντως λαμβάνει χώρα η αντίληψη του πόνου.

2.4.5 Διένεξη για τον πόνο των ψαριών

Μπορεί όλα τα παραπάνω στοιχεία και αποδείξεις να οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα ψάρια μπορούν να βιώσουν πόνο, ωστόσο πολλοί είναι εκείνοι που αντιτίθενται σε αυτές τις απόψεις. Η έλλειψη νεοφλοιού από τον εγκέφαλο των ψαριών έχει οδηγήσει πολλούς επιστήμονες, όπως ο Rose (2002, 2007), να υποστηρίζουν ότι τα ψάρια δεν είναι σε θέση να βιώσουν πόνο. Ο Rose υπογραμμίζει πως «η αντίληψη του πόνου είναι μια συνειδητή εμπειρία και δεδομένου ότι η συνείδηση βρίσκεται, τουλάχιστον εν μέρει, στον νεοφλοιό, τα ζώα χωρίς νεοφλοιό δεν έχουν αντίληψη

πόνου. Αυτό σημαίνει ότι τα ψάρια, καθώς δεν έχουν νεοφλοιό, δεν είναι ικανά να αντιληφθούν τον πόνο». Ενώ αυτή η γραμμή επιχειρημάτων είναι συνεπής από μόνη της, το κρίσιμο ερώτημα είναι εάν η αντίληψη του πόνου εξαρτάται όντως αποκλειστικά από τον νεοφλοιό, όπως ισχυρίζεται ο Rose (2002) και άλλοι μελετητές. Δύο σενάρια μπορεί να είναι πιθανά:

- θα μπορούσε μια (απλή) αντίληψη του πόνου να προκύψει από τη δραστηριότητα μη νεοφλοιωδών στοιχείων της μήτρας του πόνου, όπως οι υποφλοιώδεις περιοχές, ο θάλαμος και το εγκεφαλικό στέλεχος; Θα μπορούσε η ολοκληρωμένη δράση αυτών των περιοχών να είναι επαρκής για να δημιουργήσει μια «απλή» αίσθηση πόνου; Υποστηρίζει μια τέτοια ερμηνεία το γεγονός ότι η αντίληψη του πόνου στον άνθρωπο δεν είναι αποκλειστική λειτουργία του φλοιού, αλλά προκύπτει από την ολοκληρωμένη δραστηριότητα της μήτρας του πόνου που περιλαμβάνει νεοφλοιώδεις καθώς και μη νεοφλοιώδεις περιοχές; Αυτό οδηγεί επίσης στο ερώτημα σχετικά με την εξέλιξη της αντίληψης του πόνου: Ο πόνος εξελίχθηκε μόνο με την εμφάνιση του νεοφλοιού, με μηδενική αντίληψη πριν από την παρουσία του νεοφλοιού, αλλά πλήρης αντίληψη πόνου μόλις εξελίχθηκε ο νεοφλοιός; Ή μήπως υπήρξε μια πιο σταδιακή εξέλιξη των συναισθημάτων και των αισθήσεων που σχετίζονται με τον πόνο, ξεκινώντας ως μια απλή εμπειρία πόνου που διαμεσολαβείται από φυλογενετικά μεγαλύτερες περιοχές του εγκεφάλου;
- ο νεοφλοιός είναι ένα ιδιαίτερο εξελικτικό χαρακτηριστικό των σπονδυλωτών θηλαστικών. Άλλες κατηγορίες σπονδυλωτών έχουν ακολουθήσει διαφορετικές οδούς εξέλιξης του εγκεφάλου. Μήπως αυτές οι κατηγορίες σπονδυλωτών που δεν διαθέτουν νεοφλοιό χρησιμοποιούν άλλες περιοχές του εγκεφάλου για λειτουργίες που στα θηλαστικά εκτελούνται από τον νεοφλοιό (Chandross et al., 2004a, Huntingford et al., 2006, EFSA, 2009);

Η άποψη του Rose είναι πως οι υποφλοιώδεις περιοχές από μόνες τους, εν τη απουσία του ανώτερου ολοκληρωμένου συστήματος όπως ο νεοφλοιός, δεν είναι σε θέση να δημιουργήσουν αίσθηση πόνου. Σύμφωνα με τον ίδιο, οι περιοχές του εγκεφάλου και του υποφλοιώδους στελέχους μπορεί να είναι σε θέση να ρυθμίζουν τις αντιληπτικές διεργασίες στον φλοιό, αλλά δεν μπορούν να εκτελέσουν τη διαδικασία αντίληψης μόνες τους, χωρίς φλοιό. Ο Rose (2002) επίσης στηρίζει την

άποψη του από παρατηρήσεις σε ανθρώπους με καταστροφή του εγκεφαλικού φλοιού ή συγγενή ελλείμματα του φλοιού. Αυτά τα άτομα πιστεύεται ότι βρίσκονται σε φυτική κατάσταση στην οποία καταργείται κάθε συνειδητή επίγνωση των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων.

3. Μελέτες σε είδη ιχθύων

3.1 Πείραμα με την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*)

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ευημερία των ψαριών οδήγησε την απόφαση να εξεταστεί λεπτομερέστερα η ανατομία του περιφερικού νευρικού συστήματος στην ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*. Για να μελετήσουν επίσημα τον πόνο των ψαριών, οι Sneddon et al. (2003a,b) ακολούθησαν 3 γραμμές έρευνας:

1. Τομές του νευρικού ιστού του τριδύμου (το κύριο νεύρο του προσώπου) μελετήθηκαν για νευροανατομικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν την παρουσία των 2 εξειδικευμένων ινών που ανιχνεύουν επώδυνα ερεθίσματα, των ινών A-δέλτα και C.
2. Ποσοτικοποιήθηκαν οι ηλεκτροφυσιολογικές αποκρίσεις σε επιβλαβή ερεθίσματα.
3. Μετρήθηκε η επίδραση που είχε η επιβλαβής διέγερση στη συμπεριφορά των ψαριών.

Συγκεκριμένα, η εργασία συμπεριφοράς στόχευε στον προσδιορισμό του εάν οι αποκρίσεις που παρατηρήθηκαν στα ψάρια ήταν απλές και αντανακλαστικές στη φύση ή εάν εμπλέκονταν γνωστικές λειτουργίες ανώτερης τάξης.

Το τρίδυμο νεύρο αποτελείται από 3 κλάδους (τον οφθαλμικό, την άνω γνάθο και την κάτω γνάθο) και οι 3 αφαιρέθηκαν προσεκτικά από την ιριδίζουσα πέστροφα που είχε αναισθητοποιηθεί στο τελικό στάδιο. Οι διαφορετικές διακλαδώσεις στερεώθηκαν, ενσωματώθηκαν σε ρητίνη και στη συνέχεια λήφθηκαν λεπτές τομές 1 μm, χρωματίστηκαν και εξετάστηκαν με μικροσκόπιο φωτός (Sneddon, 2002). Χρησιμοποιώντας το μέγεθος της διαμέτρου ως περιγραφέα, αναγνωρίστηκαν οι ίνες A-δέλτα και C. Η διάμετρος και η κατανομή αυτών των ινών βρέθηκε να είναι αρκετά ομοιόμορφη και στις 3 διακλαδώσεις του τριδύμου νεύρου. Οι μη μυελινωμένες ίνες C

βρέθηκαν σε μικρές ομάδες και συσχετίστηκαν με ένα κύτταρο Schwann. Οι ίνες A-δέλτα ήταν πιο άφθονες και αποτελούσαν περίπου το ένα τρίτο όλων των τύπων ινών. Υπήρχαν επίσης ίνες A-alpha και A-beta (Sneddon, 2002). Όταν προσδιορίστηκε ποσοτικά η σχετική αφθονία των διαφορετικών τύπων ινών, υπήρχαν σχετικά λίγες ίνες C (περίπου το 4% όλων των τύπων ινών). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις σε θηλαστικά όπου έως και το 50% των ινών μπορεί να είναι ίνες C. Το γιατί υπάρχουν αυτές οι διαφορές μεταξύ θηλαστικών και ψαριών είναι ασαφές. Θα ήταν ενδιαφέρον να γνωρίζουμε εάν αυτή η χαμηλότερη συχνότητα ινών C είναι συνεπής σε άλλους νευρικούς ιστούς εντός της πέστροφας. Περιέχουν περισσότερες ίνες C άλλες περιοχές του σώματος, όπως τα πλευρά ή οι περιοχές γύρω από τα πτερύγια; Ομοίως, ο σχετικά χαμηλός αριθμός ινών C είναι συνεπής σε διαφορετικά είδη ψαριών ή ορισμένα ψάρια έχουν περισσότερες από άλλα; Και, γενικά οι υποδοχείς πόνου κατανομούνται ομοιόμορφα στο δέρμα των ψαριών ή ορισμένες περιοχές είναι πιο νευρωμένες από άλλες, όπως συμβαίνει στα πουλιά και στα θηλαστικά;

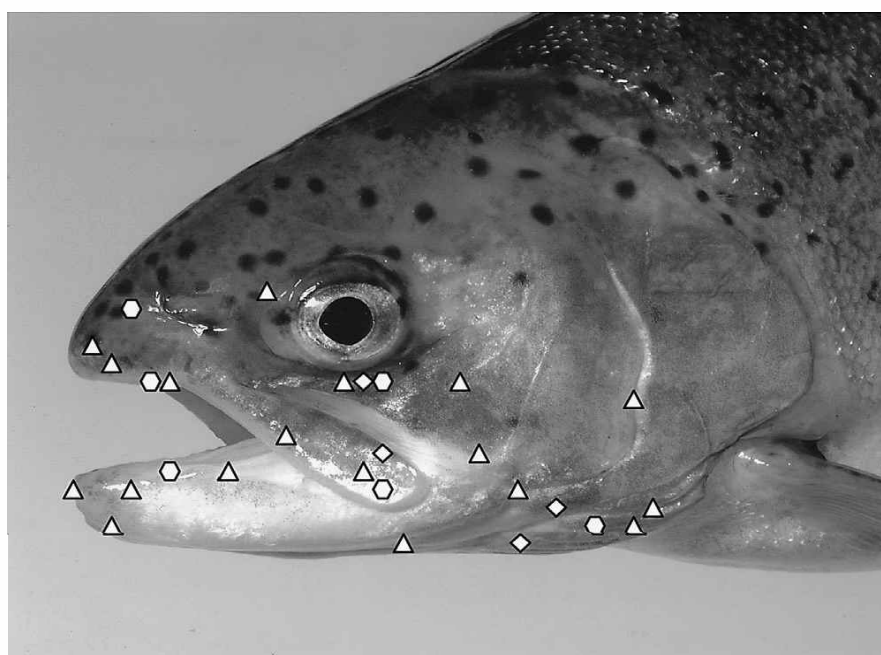
Έχοντας επιβεβαιώσει την παρουσία ινών A-δέλτα και C στο τρίδυμο νεύρο, οι Sneddon et al. (2003a) κατέγραψαν φυσιολογικά δυναμικά δράσης από σώματα προσαγωγών κυττάρων στο τρίδυμο γάγγλιο της ιριδίζουσας πέστροφας. Τα βαθιά αναισθητοποιημένα ψάρια, ξεπλυμένα με νερό και αναισθητικό πάνω από τα βράγχια, στηρίχτηκαν σε μια ειδικά κατασκευασμένη κούνια που επέτρεπε την πρόσβαση στον εγκέφαλο από ψηλά. Μετά την αφαίρεση της θήκης του εγκεφάλου και του δέρματος, τα ψάρια απεγκεφαλίστηκαν (δηλαδή αφαιρέθηκαν οι οσφριτικοί λοβοί, οι οπτικοί λοβοί και η παρεγκεφαλίδα) και χορηγήθηκε ένας νευρομυϊκός αποκλειστής για να αποτραπεί η κίνηση των μυών όπως οι συσπάσεις. Το τρίδυμο γάγγλιο στη συνέχεια αποκαλύφθηκε, αφαιρέθηκε το περίβλημα και καλύφθηκε με παραφίνη για να παραμείνει υγρό. Τα γυάλινα ηλεκτρόδια χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή της δραστηριότητας από σώματα προσαγωγών κυττάρων. Η δραστηριότητα ενός κυττάρου στο τρίδυμο καταγράφηκε ως απόκριση σε επιβλαβή ερεθίσματα που εφαρμόστηκαν στο κεφάλι του ψαριού. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι επιβλαβών ερεθισμάτων. μηχανική, χημική και θερμική πίεση. Τα πεδία των υποδοχέων στο κεφάλι του ψαριού αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας έναν γυάλινο μηχανικό ανιχνευτή και στη συνέχεια διεγέρθηκαν χρησιμοποιώντας νήματα von Frey (λεπτοί ανιχνευτές που μοιάζουν με τρίχες διαφορετικού πάχους που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των ορίων μηχανικής

διέγερσης). Η διάμετρος του πεδίου του υποδοχέα ποσοτικοποιήθηκε και στη συνέχεια δοκιμάστηκε η αντιδραστικότητα σε θερμικά και χημικά ερεθίσματα. Η θερμική ευαισθησία δοκιμάστηκε εστιάζοντας ένα φως χαλαζία στο δέρμα, προκαλώντας τη θέρμανση του υποδοχέα στους 58°C. Η χημική ευαισθησία προσδιορίστηκε με την εφαρμογή μιας μικρής σταγόνας οξικού οξέος 1% στον υποδοχέα. Μια σταγόνα νερού που εφαρμόστηκε στα δεκτικά πεδία χρησιμοποιήθηκε ως ερέθισμα ελέγχου για να προσδιοριστεί εάν η φυσική δράση της τοποθέτησης μιας σταγόνας στον υποδοχέα θα τον επηρεάσει (δεν διέγειρε ποτέ τους υποδοχείς). Οι ταχύτητες αγωγής μετρήθηκαν εφαρμόζοντας έναν ηλεκτρικό παλμό απευθείας στον υποδοχέα και στη συνέχεια χρονομετρώντας την καθυστέρηση του δυναμικού δράσης να φτάσει στο τρίδυμο γάγγλιο.

Στο κεφάλι του ψαριού βρέθηκαν πενήντα οκτώ υποδοχείς, λίγο περισσότεροι από τους μισούς από τους οποίους περιγράφηκαν ως υποδοχείς πίεσης ή αφής. Ωστόσο, 22 από τους 58 υποδοχείς ταξινομήθηκαν ως υποδοχείς πόνου (Εικόνα 8). Αυτοί ανταποκρίθηκαν με ένα αργά προσαρμοζόμενο σχέδιο πυροδότησης στη μηχανική διέγερση του νήματος von Frey. Ταυτοποιήθηκαν δύο τύποι αλγοϋποδοχέων. 18 υποδοχείς ταξινομήθηκαν ως πολυτροπικοί αλγοϋποδοχείς λόγω του ότι ανταποκρίθηκαν σε μηχανικά, θερμικά και χημικά ερεθίσματα και 4 ταξινομήθηκαν ως μηχανοθερμικοί αλγοϋποδοχείς (Πίνακας 1). Έτσι, ηλεκτροφυσιολογικές ενδείξεις, μαζί με την παρουσία των ινών A-δέλτα και C, υποδεικνύουν ότι τα τελεοστοειδή ψάρια όπως η πέστροφα διαθέτουν την απαραίτητη νευροανατομία και νευροφυσιολογία για να μεταφέρουν και να επεξεργάζονται πληροφορίες σχετικά με ερεθίσματα που θα μπορούσαν να θεωρηθούν επώδυνα από τον άνθρωπο. Συνεπώς, το παραπάνω πείραμα δείχνει ότι τα ψάρια έχουν τα βασικά νευρωνικά συστήματα για την αντίληψη επιβλαβών ερεθισμάτων.

	Πολυτροπικοί υποδοχείς (18)	Μηχανοθερμικοί υποδοχείς (4)	Μηχανοχημικοί υποδοχείς (6)
Διάμετρος υποδοχέα (mm)	3.20 ± 0.4	2.83 ± 1.0	2.52 ± 0.4
Μηχανικό όριο (g)	0.83 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.78 ± 0.53
Θερμικό όριο (°C)	49.3 ± 1.4	46.2 ± 2.4	Όχι
Απόκριση σε οξύ	Ναι	Όχι	Ναι
Ταχύτητα αγωγής (m/s)	3.96 ± 0.4	3.71 ± 0.5	4.28 ± 0.1

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των τριών τύπων υποδοχέων που βρέθηκαν στο κεφάλι της ιριδίτσουσας πέστροφας (Sneddon et al., 2003).



Εικόνα 8. Θέση των πολυτροπικών μηχανοϋποδοχέων ή αλγοϋποδοχέων, μηχανοθερμικών υποδοχέων και μηχανοχημικών υποδοχέων στο κεφάλι και το πρόσωπο της ιριδίτσουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss*. Τα τρίγωνα απεικονίζουν

τους πολυτροπικούς υποδοχείς πόνου, τα διαμάντια τους μηχανοθερμικούς υποδοχείς και τα εξάγωνα τους μηχανοχημικούς υποδοχείς (Sneddon, 2003).

Για να συμπεράνουμε ότι στις συμπεριφορικές αντιδράσεις εμπλέκεται μια πιο περίπλοκη γνώση, πρέπει να δείξουμε ότι η συναισθηματική κατάσταση του ψαριού έχει αλλάξει ως απόκριση στο ερέθισμα, για παράδειγμα το αν έχει αλλάξει η προσοχή του ή το κίνητρό του να εκτελέσει μια πράξη ως απόκριση στο ερέθισμα. Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστεί αυτό, είναι να θεωρήσουμε την κατάσταση των κινήτρων του ψαριού ως μια συναισθηματική κατάσταση (μια κατάσταση που αποκαλύπτει κάτι για την ψυχική κατάσταση ή τη «διάθεση» ενός ζώου (Paul et al., 2005). Θα μπορούσαμε να το ποσοτικοποιήσουμε αυτό προσδιορίζοντας εάν ένα ζώο αντιλαμβάνεται ένα ερέθισμα ως θετικό ή αρνητικό (δηλαδή είναι πρόθυμο να εργαστεί για να αποκτήσει το ερέθισμα ή επιδιώκει να το αποφύγει;). Οι συναισθηματικές καταστάσεις θεωρούνται γνωστικές διεργασίες υψηλότερης τάξης επειδή είναι πιθανό να περιλαμβάνουν σημαντική επεξεργασία πληροφοριών στην οποία πρέπει να αξιολογηθούν και να ενσωματωθούν πολλαπλές πληροφορίες για να δημιουργηθεί μια κατάλληλη απόφαση ή απόκριση συμπεριφοράς.

Στο πείραμα που σχεδίασαν οι Sneddon et al. (2003) θέλησαν να δώσουν απάντηση στο πώς η ανίχνευση επώδυνων ερεθισμάτων αντανακλάται στη συμπεριφορά των ψαριών. Συγκεκριμένα, 20 νεαρές ιριδίζουσες πέστροφες (30 έως 100 g) στεγάστηκαν ξεχωριστά σε δεξαμενές που παρείχαν μια προστατευμένη, σκοτεινή περιοχή στο μισό της δεξαμενής και μια ανοιχτή περιοχή που περιείχε έναν επιφανειακό δακτύλιο τροφής συνδεδεμένο με τον τοίχο στην απέναντι πλευρά της δεξαμενής. Πριν από τις δοκιμές, τα ψάρια είχαν προετοιμαστεί για να πλησιάσουν τον δακτύλιο τροφής ως απόκριση σε ένα ελαφρύ σύνθημα. Μόλις μαθεύτηκε η εξαρτημένη απόκριση, οι πέστροφες κατανεμήθηκαν τυχαία σε 1 από 4 θεραπείες. Δύο από αυτές ήταν διαδικασίες ελέγχου και δύο εφάρμοσαν επιβλαβή διέγερση. Όλα τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν και στη συνέχεια η πρώτη ομάδα ελέγχου αφέθηκε να αναρρώσει. Τα ψάρια στη δεύτερη ομάδα ελέγχου έλαβαν 0,1 ml φυσιολογικού ορού που εγχύθηκε στο ρύγχος κοντά στο στόμα και μια τρίτη ομάδα αντιμετωπίστηκε με τον ίδιο τρόπο, αλλά τους ενέθηκαν 0,1 ml 0,1% διάλυμα οξικού οξέος και 1/4 εγχύθηκε με 0,1 ml δηλητηρίου μέλισσας (1 mg ml⁻¹ αλατούχο διάλυμα). Τα 2 επιβλαβή ερεθίσματα επιλέχθηκαν λόγω των γνωστών επιδράσεών τους στα θηλαστικά. Το οξικό οξύ είναι

ένα ερέθισμα που είναι γνωστό ότι διεγείρει τους αλγοϋποδοχείς των θηλαστικών και το δηλητήριο της μέλισσας προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση. Όλα τα ψάρια παρατηρήθηκαν καθώς ανέρρωσαν και το κίνητρό τους να τραφούν μετρήθηκε από την απόκρισή τους στο φως που σηματοδοτούσε τη διαθεσιμότητα τροφής.

Οι πέστροφες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με επιβλαβή ερεθίσματα (οξικό οξύ ή δηλητήριο μέλισσας) έδειξαν παρατεταμένη καταστολή στο κίνητρό τους να τραφούν. Αυτά τα ψάρια χρειάστηκαν 170 λεπτά κατά μέσο όρο προτού αρχίσουν να πλησιάζουν τον δακτύλιο τροφής, σε αντίθεση με τα 80 λεπτά που χρειάστηκαν για να ξεκινήσουν να τρέφονται τα ψάρια ελέγχου και φυσιολογικού ορού. Το κατασταλαμένο κίνητρο για τροφή παρατηρήθηκε όταν προσφέρθηκε στα ψάρια η κανονική διατροφή τους με τροφή πέλλετ, αλλά φάνηκε επίσης όταν προσφέρθηκε προτιμώμενο θήραμα (ζωντανό σκουλήκι αίματος). Ο ακριβής μηχανισμός που κρύβεται πίσω από αυτήν την παρατηρούμενη μείωση του κινήτρου σίτισης δεν είναι ακόμη γνωστός, αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι η κορτιζόλη (μια κορτικοστεροειδής ορμόνη που εμπλέκεται στις αποκρίσεις στο στρες) μπορεί να επηρεάσει τις μαθημένες εξαρτημένες αποκρίσεις (Grillon et al., 2004).

3.2 Πείραμα με το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*)

Οι Correia et al. (2011) επέλεξαν να διεξάγουν το πείραμα τους σε ψάρια ζέβρες και να παρατηρήσουν τις αντιδράσεις τους σε επώδυνα ερεθίσματα καθώς και στα αναλγητικά φάρμακα. Επιλέχθηκε το ψάρι ζέβρα καθώς το νευρικό του σύστημα μοιράζεται πολλές θεμελιώδεις ομοιότητες με άλλα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένου του οπιοειδούς συστήματος (Gonzalez-Nunez & Rodriguez, 2009, Sneddon, 2009). Χρησιμοποιήθηκε το ψάρι ζέβρα για να αναπτυχθεί μια οξεία συμπεριφορική δοκιμασία πόνου που παρακολουθεί μεμονωμένες αποκρίσεις κούμψης σε ένα επιβλαβές χημικό ερέθισμα. Με βάση μια ηλεκτρονική συσκευή βιοαισθητήρα (MOBS), καταγράφηκαν κινητικές αποκρίσεις στο οξικό οξύ, έναν επιβλαβή παράγοντα που μειώνει τη δραστηριότητα του ψαριού ζέβρα (Reilly et al., 2008). Αυτές οι παθογόνες αποκρίσεις στο οξικό οξύ είναι η βάση του μοντέλου και ερευνήθηκαν σε μελέτες χρονικής πορείας στην εφαρμογή και την ευρωστία του με θεραπείες ενός αναλγητικού φαρμάκου (μορφίνη) και ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα

οπιοειδών (ναλοξόνη). Πρώτα δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές δόσεις οξικού οξέος για να υπολογιστεί η βέλτιστη δόση. Ως «βέλτιστη» ορίζεται μια δόση που μειώνει τη δραστηριότητα των ψαριών με σταθερό τρόπο ώστε να γίνει ένα πείραμα, αλλά δεν ήταν υπερβολική δόση που είχε ως αποτέλεσμα τη συμπεριφορά παγώματος ή τον θάνατο. Μια ισχυρή διαφορά μεταξύ της ανταπόκρισης των ψαριών ελέγχου και των παθογόνων αποκρίσεων είναι επίσης σημαντική από στατιστικής άποψης, καθώς υποστηρίζει την ανίχνευση σημαντικών αλλαγών στην αποκριτική δραστηριότητα (π.χ. απόκριση σε περαιτέρω φαρμακευτικές θεραπείες), ειδικά καθώς τα τελικά σημεία συμπεριφοράς παρουσιάζουν συνήθως υψηλή διακύμανση. Για την μελέτη εύρεσης δόσης, εκτός από τον βιοαισθητήρα MOBS, χρησιμοποιήθηκε και παρακολούθηση βίντεο. Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του αυτόματου συστήματος, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως τυπικό σύστημα καταγραφής σε επόμενες μελέτες.

3.2.1 1^η μελέτη- Συμπεριφορικό μοντέλο του ψαριού ζέβρα

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιορίσει μια αποτελεσματική δόση οξικού οξέος χωρίς απώλεια ψαριών λόγω συμπεριφοράς παγώματος ή θνησιμότητας. Δύο δόσεις οξικού οξέος (5% και 10%) επιλέχθηκαν με βάση δεδομένων της βιβλιογραφίας (Reilly et al., 2008) και δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα MOBS. Η υψηλότερη δόση ευνοήθηκε ως προεπιλεγμένη αποκριτική δόση για το τελικό μοντέλο υπό την προϋπόθεση: 1) σημαντικά χαμηλότερη δραστηριότητα των ψαριών σε σύγκριση με τις αποκρίσεις σε 5% οξικό οξύ, 2) σταθερή απόκριση κατά την περίοδο καταγραφής και 3) όχι μεγαλύτερη απώλεια ψαριών από ότι για τους ελέγχους. Η μελέτη με το σύστημα MOBS αποτελούνταν από έξι πειράματα, το καθένα από τα οποία περιλάμβανε δύο μάρτυρες και τις δύο θεραπείες οξικού οξέος και ένα πείραμα με δύο μάρτυρες και δύο θεραπείες οξικού οξέος 10%. Για το σύστημα παρακολούθησης βίντεο, η διαδικασία έγχυσης ήταν η ίδια, όπου και πάλι δοκιμάστηκαν τέσσερα ψάρια την ημέρα, με 8 πειραματικές σειρές με δύο μάρτυρες και δύο θεραπείες οξικού οξέος 10%, και μια τελική δοκιμή με θεραπείες μόνο με φυσιολογικό ορό.

3.2.2 2^η μελέτη- Επίδραση της μορφίνης στην απόκριση

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μορφίνης στην πρόκληση συμπεριφοράς κατά της επώδυνης διέγερσης στο μοντέλο ψαριού ζέβρα. Τα ψάρια υποβλήθηκαν αρχικά σε θεραπεία με δύο δόσεις μορφίνης (3 και 6 mg/kg) και στη συνέχεια διεγέρθηκαν με οξικό οξύ χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία όπως στην πρώτη μελέτη. Επιπλέον, δοκιμάστηκε μια ομάδα ελέγχου ψαριών, που έλαβαν θεραπεία με αλατούχο διάλυμα αντί για μορφίνη. Και οι τρεις θεραπείες χορηγήθηκαν ενδομυϊκά σε αναισθητοποιημένα ψάρια, με μορφίνη σε συνολικό όγκο 3,0 μL ανά 0,5 g ψαριού. Δοκιμάστηκαν δύο ομάδες ελέγχου, η πρώτη μόνο με μορφίνη και η δεύτερη μόνο με φυσιολογικό ορό, δηλαδή τα ψάρια και από τις δύο αυτές ομάδες ελέγχου δεν εκτέθηκαν σε οξικό οξύ.

3.2.3 3^η μελέτη- Τροποποίηση της επίδρασης της μορφίνης με ναλοξόνη

Ο σκοπός της τρίτης μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν η αντι-αποκριτική συμπεριφορά που προκαλείται από τη μορφίνη θα μπορούσε να μεταβληθεί από τη ναλοξόνη, έναν ανταγωνιστή των υποδοχέων οπιοειδών. Δοκιμάστηκαν δύο ομάδες θεραπείας, με τα ψάρια να λαμβάνουν είτε 6 mg/kg μορφίνης μαζί με αλατούχο διάλυμα ή 6 mg/kg μορφίνης μαζί με 6 mg/kg ναλοξόνης. Η μορφίνη και η ναλοξόνη (ή αλατούχο διάλυμα) συγχορηγήθηκαν ενδομυϊκά (6 mg/kg, σε συνολικό όγκο 6 μL) σε προαναισθητοποιημένα ψάρια με χρήση αεροστεγούς σύριγγας RN (Hamilton). Τα ψάρια και από τις δύο ομάδες υποβλήθηκαν αργότερα σε θεραπεία με ενέσεις οξικού οξέος 10% στα χείλη.

3.3 Αποτελέσματα

Όσον αφορά τη πρώτη μελέτη, οι αλλαγές χρονικής πορείας στη δραστηριότητα του ψαριού ζέβρα καταγράφηκαν από το σύστημα MOBS για 80 λεπτά μετά από περίοδο αποκατάστασης 30 λεπτών μετά την ένεση. Και οι δύο θεραπείες οδήγησαν σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας, ενώ και οι τρεις θεραπείες (μάρτυρας φυσιολογικού ορού, 5%, 10%) διέφεραν όλες σημαντικά μεταξύ τους. Τα ψάρια ελέγχου με φυσιολογικό ορό ήταν λιγότερο ενεργά από ό,τι πριν από τη θεραπεία αλλά

αυτή η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ψάρια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με οξικό οξύ 10% εμφάνισαν μια ισχυρή και σταθερή μείωση στη δραστηριότητα τους για 60 λεπτά μετά την ένεση. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε ένεση οξικού οξέος 10% ως το επιβλαβές ερέθισμα σε όλες τις επόμενες μελέτες. Στις δοκιμές με τη χρήση βιντεοκάμερας, όντας παρόμοια με τη χρήση MOBS, η καταγραφή έγχυσης οξέος 10% είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της δραστηριότητας των ψαριών. Σε αυτές τις δοκιμές, η δραστηριότητα συνέχισε να μειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης και οι κλίσεις της μείωσης της δραστηριότητας με το χρόνο διέφεραν μεταξύ του ορού ελέγχου και της ένεσης οξικού οξέος 10%. Οι μάρτυρες με αλατούχο διάλυμα ανέκαμψαν μόνο στο 80% από τη δραστηριότητά τους πριν από την επεξεργασία, ενώ τα ψάρια που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με οξύ παρουσίασαν στο τέλος μειωμένες δραστηριότητες που ήταν συγκρίσιμες με αυτές που καταγράφηκαν από το MOBS.

Η μορφίνη που εγχύθηκε πριν από την ένεση οξέος αραίωσε τη μείωση της δραστηριότητας που σχετίζεται με το επιβλαβές ερέθισμα. Και οι δύο θεραπείες με μορφίνη είχαν ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα σε σύγκριση με τα ψάρια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με οξύ, αλλά δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Ωστόσο, αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό επειδή δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των δόσεων κατά τα πρώτα 60 λεπτά της περιόδου καταγραφής. Η διαφορά μεταξύ των δόσεων ήταν σημαντική λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα τελευταία 60 λεπτά της περιόδου καταγραφής. Τα ψάρια ελέγχου με αλατούχο ορό ανταποκρίθηκαν με σχεδόν την ίδια δραστηριότητα που μετρήθηκε πριν από τη θεραπεία. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα από την πρώτη μελέτη, η διακύμανση σε όλες τις ομάδες θεραπείας ήταν μεγαλύτερη, αντανακλώντας πιθανώς υψηλότερο βαθμό ατομικής συμπεριφοράς στην πιο περίπλοκη διαδικασία ένεσης. Ωστόσο, οι αποκρίσεις των ψαριών στο επιβλαβές ερέθισμα με οξύ ήταν σε καλή συμφωνία μεταξύ των δύο μελετών και δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τα αποτελέσματά αυτά δείχνουν ότι το μοντέλο έχει καλή αναπαραγωγιμότητα και είναι στιβαρό. Η μορφίνη από μόνη της (δηλαδή, απουσία οποιουδήποτε επιβλαβούς ερεθίσματος) είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή μείωση στη δραστηριότητα των ψαριών αλλά τα επίπεδα δραστηριότητας δεν διέφεραν από τους μάρτυρες αλατούχου ορού. Δηλαδή, η μορφίνη από μόνη της, δεν είχε σημαντική επίδραση.

Αναφορικά με την τροποποίηση της αναλγητικής επίδρασης, η μείωση της δραστηριότητας των ψαριών που προκλήθηκε από την έγχυση οξικού οξέος 10% μετριάστηκε με προηγούμενη ένεση 6 mg/kg μορφίνης, με αποτέλεσμα ένα σταθερό επίπεδο δραστηριότητας περίπου 70% στο τέλος της καταγραφικής περιόδου. Σε σύγκριση με τα ψάρια από τη μελέτη 2 που έλαβαν ενδομυϊκή θεραπεία μόνο με μορφίνη, αυτά τα αποτελέσματα ήταν πολύ παρόμοια, υποδεικνύοντας ότι το αλατούχο διάλυμα δεν είχε σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Η εξασθένηση της μείωσης της δραστηριότητας μπλοκαρίστηκε όταν η ναλοξόνη εγχύθηκε ταυτόχρονα με τη μορφίνη. Οι θεραπείες της μορφίνης με και χωρίς ναλοξόνη ήταν σημαντικά διαφορετικές σε όλες τις χρονικές περιόδους μετά την ένεση οξέος. Η μέση δραστηριότητα από τα ψάρια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με ναλοξόνη και μορφίνη ήταν ελαφρώς μόνο υψηλότερη από ότι από ψάρια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία μόνο με ένεση στα χείλη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ναλοξόνη εξουδετερώνει τις επιδράσεις της μορφίνης.

Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι η κινητική απόκριση σε ένα επιβλαβές χημικό ερέθισμα στα ψάρια ζέβρα είναι ένα ευαίσθητο και ισχυρό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση αναλγητικών. Η απόκριση κλιμακούμενη με την ένταση του ερεθίσματος, μετριάστηκε από τη μορφίνη με τρόπο δόσοεξαρτώμενο και η ναλοξόνη εμπόδισε την αναλγητική δράση της μορφίνης. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η εγκυρότητα αυτού του συστήματος πραγματοποιώντας ένα παρόμοιο πείραμα χρησιμοποιώντας ένα σύστημα παρακολούθησης βίντεο. Και στις δύο περιπτώσεις η δραστηριότητα των ψαριών μειώθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμαστικής περιόδου μετά το επιβλαβές ερέθισμα του οξικού οξέος. Αποδείχθηκε ότι η συμπεριφορική απόκριση του ψαριού ζέβρα σε ένα επιβλαβές ερέθισμα μπορεί να αυτοματοποιηθεί από το σύστημα MOBS. Στον παρόντα πειραματικό σχεδιασμό παρακολουθήθηκαν τέσσερα ψάρια ταυτόχρονα, αλλά το παρόν σύστημα μπορούσε να παρακολουθήσει έως και 14 ψάρια (Cunha et al., 2008).

Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, μελέτες και αποδείξεις μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι προκειμένου να επιβιώσουν, τα ζώα πρέπει να αποφύγουν τους τραυματισμούς και να είναι σε θέση να ανιχνεύουν δυνητικά επιβλαβή ερεθίσματα μέσω μηχανισμών πόνου. Εάν ο τραυματισμός συνοδεύεται από ένα αρνητικό συναισθηματικό στοιχείο, η μελλοντική συμπεριφορά θα πρέπει να αλλάξει και μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το ζώο βίωσε την ενόχληση που σχετίζεται με τον πόνο. Τα ψάρια είναι η πιο επιτυχημένη ομάδα σπονδυλωτών όταν λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των ειδών που υπάρχουν στα υδάτινα οικοσυστήματα. Τα εμπειρικά στοιχεία για τον πόνο στα ψάρια από την υποκείμενη μοριακή βιολογία, τη νευροβιολογία και την ανατομία των αλγοϋποδοχέων έως τις συμπεριφορικές αποκρίσεις ολόκληρων των ζώων έχουν εξετασθεί για να καταδειχθεί η εξελικτική διατήρηση της μετάδοσης επώδυνων ερεθισμάτων και του πόνου από τα ασπόνδυλα στα σπονδυλωτά. Μελέτες σε ψάρια έδειξαν ότι η βιολογία του συστήματος του πόνου είναι εντυπωσιακά παρόμοια με αυτή των θηλαστικών. Περαιτέρω, δυνητικά επώδυνα συμβάντα οδηγούν σε συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές όπως μειωμένη δραστηριότητα, συμπεριφορά φύλαξης, αναστολή της φυσιολογικής συμπεριφοράς, αυξημένο ρυθμό αερισμού των βραγχίων και μη φυσιολογικές συμπεριφορές που όλα προλαμβάνονται με τη χρήση αναλγητικών φαρμάκων. Τα ψάρια εκτελούν επίσης τις ανταγωνιστικές εργασίες λιγότερο καλά όταν αντιμετωπίζονται με ένα υποτιθέμενο επώδυνο ερέθισμα. Επομένως, υπάρχουν άφθονα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι είναι πολύ πιθανό τα ψάρια να αισθάνονται πόνο και ότι οι αλλαγές συμπεριφοράς που σχετίζονται με τον πόνο διατηρούνται στα σπονδυλωτά.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

Altimiras J., Larsen E.J. 2000. Non-invasive recording of heart rate and ventilation rate in rainbow trout during rest and swimming: Fish go wireless! *J Fish Biol.* 57, 197-209.

Alvarez F.A., Rodriguez-Martin I., Gonzalez-Nunez V., Fernández de Velasco E.M., Sarmiento R.G., Rodríguez R.E. 2006. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett.* 405, 94-99.

Anadón R., Molist P., Rodríguez-Moldes I., Lo´pez J.M., Quintela I., Cerviño M.C., Barja P., González A. 2000. Distribution of cholineacetyltransferase immunoreactivity in the brain of an elasmobranch, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*), *J. Comp. Neurol.* 420, 139– 170.

Anil, S. S., Anil, L., & Deen, J. (2002). Challenges of pain assessment in domestic animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(3), 313–319.

Ashhurst, D. E. (2004). The cartilaginous skeleton of an elasmobranch fish does not heal. *Matrix Biol.* 23, 15-22.

Ashley, P. J., Sneddon, L. U. and McCrohan, C. R. (2006). Properties of corneal receptors in a teleost fish. *Neurosci. Lett.* 410, 165-168.

Ashley, P. J., Sneddon, L. U. and McCrohan, C. R. (2007). Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res.* 1166, 47-54.

Ashley, P. J., Ringrose, S., Edwards, K. L., Wallington, E., McCrohan, C. R. and Sneddon, L. U. (2009). Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. *Anim. Behav.* 77, 403-410.

Banik R.K., Subieta A.R., Wu C.R., Brennan T.J. 2005. Increased nerve growth factor after rat plantar incision contributes to guarding behavior and heat hyperalgesia. *Pain.* 117, 68-76.

Bateson P. 1992. Assessment of pain in animals, *Anim. Behav.* 42, 827– 839.

- Bekoff M. 2007. Aquatic animals, cognitive ethology, and ethics: questions about sentience and other troubling issues that lurk in turbid water. *Dis Aquat Org.* 75, 87–98.
- Beukema J.J. 1970. Angling experiments with carp (*Cyprinus carpio L.*): II. Decreased catchability through one trial learning, *Neth. J. Zool.* 19, 81–92.
- Beukema J.J. 1970. Acquired hook avoidance in the pike *Esox lucius L.* fished with artificial and natural baits, *J. Fish Biol.* 2, 155–160.
- Braithwaite V.A., Boulcott P., 2007. Pain perception, aversion and fear in fish.
- Broad, A., Knott, N., Turon, X. and Davis, A. R. (2010). Effects of a shark repulsion device on rocky reef fishes: no shocking outcomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 295-298.
- Broglia C., Rodriguez F. and Salas C. (2003). Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. *Fish and Fisheries*, 4, 247–255.
- Broglia C., Gomez A., Duran E., Ocana F.M., Jimenez-Moya F., Rodriguez F., Salas C. 2005. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal, and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res Bull.* 66, 277–281.
- Broom, D., & Johnson, K. (1993). Solutions and conclusions. In *Stress and animal welfare* (p. 211). London: Chapman & Hall.
- Broom, D.M. (2007). Cognitive ability and sentience: which aquatic animals should be protected? *Diseases of Aquatic Organisms*, 75, 99–108.
- Broom, D.M. (2014). *Sentience and Animal Welfare* (p. 200). Wallingford: CABI.
- Bshary R, Wickler W, Fricke H. 2002. Fish cognition: a primate's eye view. *Anim Cogn.* 5, 1–13.
- Buatti M.C., Pasternak G.W. 1981. Multiple opiate receptors: Phylogenetic differences. *Brain Res.* 218, 400-405.
- Burt de Perera T. 2004a. Spatial parameters encoded in the spatial ap of the blind Mexican cave fish, *Astyanax fasciatus*. *Anim Behav.* 68, 291–295.

Butler A.B., Hodos W. 1996. Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Wiley-Liss, New York.

Chandroo, K.P., Duncan, I.J.H. and Moccia, R.D. (2004). Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 225-250.

Chatigny F. 2019. The Controversy on Fish Pain: A Veterinarian's Perspective, *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 22:4, 400-410.

Chervova L.S. 1997. Pain sensitivity and behaviour of fishes. *J Ichthyol* 37, 98–103.

Chervova, L. S. and Lapshin, D. N. (2011). Behavioral control of the efficiency of pharmacological anesthesia in fish. *J. Ichthyol.* 51, 1126-1132.

Clark, J. D., Rager, D. R., & Calpin, J. P. (1997). Animal well-being. II. Stress and distress. *Laboratory Animal Science*, 47(6), 571–579.

Coggeshall R.E., Leonard R.B., Applebaum M.L., Willis W.D. 1978. Organisation of peripheral nerves of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*, *J. Neurophysiol.* 41, 97–107.

Colborn, D. R., Thompson, D. L., Roth, T. L., Capehart, J. S., & White, K. L. (1991). Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of Animal Science*, 69(6), 2556–2562.

Correia A.D., Cunha S.R., Scholze M., Don Stevens E., 2011. A Novel Behavioral Fish Model of Nociception for Testing Analgesics.

Cruce W.L.R., Stuesse S.L., Northcutt R.G. 1999. Brainstem neurons with descending projections to the spinal cord of two elasmobranch fishes: thornback guitarfish, *Platyrrhinoidis triseriata*, and horn shark, *Heterodontus francisci*, *J. Comp. Neurol.* 403, 534– 560.

Cunha, S.R.; Gonçalves, R.; Silva, S.R.; Correia, A.D. 2008. An automated marine biomonitoring system for assessing water quality in real-time. 17, 558-564.

Dawkins, M. S. (1998). Evolution and animal welfare. *The Quarterly Review of Biology*, 73(3), 305–328.

Dawkins, M. S. (2016). Animal welfare with and without consciousness. *Journal of Zoology*, 1–10.

Dunlop, R. and Laming, P. (2005). Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Pain*. 6, 561-568.

Dunlop, R., Millsopp, S. and Laming, P. (2006). Avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) and implications for pain perception. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97, 255-271.

Duran E., Ocana F.M., Broglio C., Rodriguez F., Salas C. 2010. Lateral but not medial telecephalic pallium ablation impairs the use of goldfish spatial allocentric strategies in a “hole-board” task. *Behav Brain Res.* 214, 480–487.

Ebbesson S.O.E, Hodde K.C. 1981. Ascending spinal systems in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, *Cell Tissue Res.* 216, 313– 331.

Echteler S.M., Saidel W.M. 1981. Forebrain connections in goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. *Science* 212, 683–684.

EFSA Scientific Opinion. 2009. General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *The EFSA Journal.* 954, 1–27.

Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., Elkhyat S.I., Bartels B.K., Tien A.K., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukuwska Z., Kalueff A.V. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 205, 38–44.

Ehrensing, R.H., Michell, G.F. and Kastin, A.J. (1982). Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in *Carassius auratus*. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 17, 757–761.

Finger T.E. 1981. Fish that taste with their feet: Spinal sensory pathways in the sea robin, *Prionotus carolinus*. *Biol Bull.* 161, 154-161.

Finger T.E. 2000. Ascending spinal systems in the fish, *Prionotus carolinus*. *J Comp Neurol.* 422, 106-122.

- Gaikwad S., Stewart A., Hart P., Wong K., Piet V., Cachahat J., Kalueff A.V. 2011. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memories tests: the utility of fish models to study stress-memory interplay. *Behav Proc.* 87, 224–230.
- Goehler L.E., Finger T.E 1996. Visceral afferent and efferent columns in the spinal cord of the teleost, *Ictalurus punctatus*, *J. Comp. Neurol.* 371, 437–447.
- Gonzalez-Nunez V., Rodríguez R.E. The zebrafish: A model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR J* 50, 373-386.
- Heupel, M. R., Simpfendorfer, C. A. and Bennett, M. B. (1998). Analysis of tissue responses to fin tagging in Australian carcharhinids. *J. Fish Biol.* 52, 610-620.
- 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(2), 332–372.
- IASP (1979) Pain terms: A list with definitions and notes on usage, *Pain*, 6, pp. 249–252.
- Iwahori N., Kawawaki T., Baba J. 1998. Neuronal organisation of the spinal cord in the red stingray (*Dasyatis akajei*: Chondrichthyes), *J. Brain Res.* 39, 103– 116.
- Kajiura, S. M., Sebastian, A. P. and Tricas, T. C. (2000). Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Environ. Biol. Fish.* 58, 23-31.
- Kalmijn, A. J. (1971). The electric sense of sharks and rays. *J. Exp. Biol.* 55, 371-383.
- Kardong K.V. 2006. *Vertebrates – Comparative Anatomy, Function and Evolution*. 4th edition. McGraw Hill, New York.
- Kavaliers M., Perrot-Sinal T.S., Desjardins D.C., Cross-Mellor S.K., Wiebe J.P 2000. Antinociceptive effects of the neuroactive steroid, 3-alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and progesterone in the land snail, *Capaea nemoralis*, *Neuroscience* 95, 807– 812.
- Key, B. (2016). Why fish do not feel pain. *Animal Sentience* 2016.003.

- Kitchener, P. D., Fuller, J. and Snow, P. J. (2010). Central projections of primary sensory afferents to the spinal dorsal horn in the long-tailed stingray, *Himantura fai*. *Brain Behav. Evol.* 76, 60-70.
- Kotrschal K., van Staaden M.J., Huber R. 1998. Fish brains: evolution and environmental relationships. *Rev Fish Biol Fisheries* 8, 373–408.
- Kotrschal A., Taborsky B. 2010. Environmental change enhances cognitive abilities in fish. *PloS One* 8, e1000351.
- Kwan C.L., Crawley A.P., Mikulis D.J., Davis K.D. 2000. An fMRI study of anterior cingulate cortex and surrounding medial wall activations evoked by noxious cutaneous heat and cold stimuli. *Pain* 85, 359–374.
- Laland K.N., Brown C., Krause J. 2003. Learning in fishes: from three second memory to culture. *Fish Fisheries* 4, 199–202.
- Li X., Keith D.E Jr, Evans C.J. 1996. Mu opioid receptor-like sequences are present throughout vertebrate evolution. *J Molecular Evol.* 43, 179- 184.
- Lorenzetti F.D., Mozzachiodi R., Baxter D.Q., Bryne J.H. 2006. Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nature neurosci.* 9, 17–19.
- Matthews, G. and Wickelgren, W. O. (1978). Trigeminal sensory neurons of the sea lamprey. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 123, 329-333.
- McDonald L.K., Dores R.M. 1991. Detection of met-enkephalin in the CNS of teleosts *Anguilla rostrata* and *Oncorhynchus kisutch*. *Peptides* 12, 541–547.
- McCormick, S. D., Regish, A., O’Dea, M. F., & Shrimpton, J. M. (2008). Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺,K⁺-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 157(1), 35–40.
- Medina L., Abellan A. 2009. Development and evolution of the pallium. *Semin Cell Dev Biol.* 20, 698–711.

- Mellor, D., & Stafford, K. (1999). Assessing and minimising the distress caused by painful husbandry procedures in ruminants. *Practice*, 21(8), 436–446.
- Mettam J.M., Oulton L.J., McCrohan C.R., Sneddon L.U. 2011 The efficacy of three types of analgesic drug in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 133, 265–274.
- Millsopp, S. and Laming, P. (2008). Trade-offs between feeding and shock avoidance in goldfish (*Carassius auratus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 113, 247-254.
- Molony, V., & Kent, J. E. (1997). Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *Journal of Animal Science*, 75(1), 266–272.
- Murray, R. W. (1962). The response of the Ampullae of Lorenzini of elasmobranches to electrical stimulation. *J. Exp. Biol.* 39, 119-128.
- New J.G., Northcutt R.G. 1984. Primary projections of the trigeminal nerve in two species of sturgeon: *Acipenser oxyrinchus* and *Scaphirhynchus platyrhynchus*, *J. Morphol.* 182, 125– 136.
- Nieuwenhuys R., ten Donkelaar H.J., Nicholson C. 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer, Berlin.
- Nordgreen J., Horsberg T.E., Ranheim B., Chen C.A.N. 2007. Somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. *J Comp Physiol A* 193, 1235-1242.
- Paul E.S., Harding E.J., Mendl M. (2005) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 469–491.
- Pham, T. M., Hagman, B., Codita, A., Van Loo, P. L. P., Strömmer, L. and Baumans, V. (2010). Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiol. Behav.* 99, 663-668.
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1983). Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta L.* *General and Comparative Endocrinology*, 49(2), 232–239.

- Porcher, I. F. (2005). On the gestation period of the blackfin reef shark, *Carcharhinus melanopterus*, in waters off Moorea, French Polynesia. *Mar. Biol.* 146, 1207-1211.
- Portavella, M., Torres, B. and Salas, C. (2004). Avoidance response in goldfish: Emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *Journal of Neuroscience*, 24, 2342–2335.
- Porteros A., García-Isidoro M., Barrallo A., González-Sarmiento R., Rodríguez R.E. 1999. Expression of ZFOR1, a δ -opioid receptor, in the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 412,429-438.
- Reese E.S. 1989. Orientation behaviour of butterfly fishes (family Chaedontidae) on coral reefs: spatial learning of route-specific landmarks and cognitive maps. *Environ Biol Fish.* 25, 79–86.
- Reilly S.C., Quinn J.P., Cossins A.R., Sneddon L.U. 2008a. Novel candidate genes identified in the brain during nociception in common carp. *Neuro Sci Lett.* 437, 135-138.
- Reilly S.C., Quinn J.P., Cossins A.R., Sneddon L.U. 2008b. Behavioral analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Appl Anim Behav Sci.* 114, 248-249.
- Rink, E. and Wullimann, M. F. (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res.* 1011, 206-220.
- Rodríguez-Moldes I., Manso M.J., Becerra M., Molist P., Anadón R. 1993. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the brain of the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*, *J. Comp. Neurol.* 335, 228– 244.
- Ronan M. 1988. The sensory trigeminal tract of Pacific hagfish. Primary afferent projections and neurons of the tract nucleus, *Brain Behav. Ecol.* 32, 169– 180.
- Roques, J. A. C., Abbink, W., Geurds, F., van de Vis, H. and Flik, G. (2010). Tailfin clipping, a painful procedure: studies on Nile tilapia and common carp. *Physiol. Behav.* 101, 533-540.

- Roques, J. A. C., Abbink, W., Chereau, G., Fourneyron, A., Spanings, T., Burggraaf, D., van de Bos, R., van de Vis, H. and Flik, G. (2012). Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1019-1028.
- Rose J.D. 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev Fish Sci.* 10, 1-38.
- Rose J.D. 2007. Anthropomorphism and mental welfare of fishes. *Dis Aquat Org.* 75, 139–154.
- Rose, J. D., Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Diggles, B. K., Sawynok, W., Stevens, E. D. and Wynne, C. D. L. (2014). Can fish really feel pain? *Fish Fisheries* 15, 97-133.
- Rosenblum P.M, Callard I.P. 1988. Endogenous opioid peptide system in male brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* LeSueur: characterization of naloxone binding and the response to naloxone during the annual reproductive cycle. *J Exp Zool.* 245, 244–255.
- Roveroni R.C., Parada C.A., Cecilia M., Veiga F.A., Tambeli C.H. 2001. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. *Pain* 94, 185-191.
- Salas C., Broglio C., Duran E., Gomez A., Ocana F.M., Jimenez-Moya F., Rodriguez F. 2006. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish* 3, 157–171.
- Schulman J.A., Finger T.E., Brecha N.C., Karten H.J. 1981. Enkephalin immunoreactivity in Golgi cells and mossy fibers of mammalian, avian and teleost cerebellum. *Neurosci.* 6, 2407-2416.
- Segner H. 2012. Fish Nociception and pain. A biological perspective
- Shega J.W., Rudy T., Keefe F.J., Perri L.C., Mengin O.T., Weiner D.K. 2008. Validity of pain behaviors in persons with mild to moderate cognitive impairment. *J Am Geriatrics Soc.* 56, 1631-1637.
- Simantov R., Kuhar M.J., Uhl G.R., Snyder S.H. 1977. Opioid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 2167-2171.

- Sison M, Gerlai R. 2010. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav Brain Res.* 207, 99–104.
- Sloman K.A., Wilson R.W., Balshine S. 2006. Behaviour and physiology of fish. Elsevier, Amsterdam.
- Sneddon L.U. 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neurosci Lett.* 319, 167-171.
- Sneddon L.U. 2003a. Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Res.* 972, 44-52.
- Sneddon L.U. 2003b. The evidence for pain in fish: The use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci.* 8, 153-162.
- Sneddon L.U., Braithwaite V.A., Gentle M.J. 2003 Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. *J. Pain* 4, 431–440.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., & Gentle, M. J. (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society*, 270(1520), 1115–1121.
- Sneddon L.U. 2004. Evolution of nociception in vertebrates: Comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Rev.* 46, 123-130.
- Sneddon, L. U. (2009). Pain perception in fish: indicators and endpoints. *ILAR J.* 50, 338-342.
- Sneddon, L. U. (2011). Pain perception in fish: evidence and implications for the use of fish. *J. Conscious. Stud.* 18, 209-229.
- Sneddon, L. U., Elwood, R. W., Adamo, S. A., & Leach, M. C. (2014). Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour*, 97, 201–212.
- Sneddon L.U. 2015 Pain in aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 218, 967–976.
- Sneddon L.U. 2018 Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology* 33, 63–73.

- Sneddon L.U., Lopez-Luna J., Wolfenden D.C.C., Leach M.C., Valentim A.M., Steenbergen P.J., Bardine N., Broom D.M., Brown C. 2018 Ample evidence for fish sentience and pain. *Anim. Sentience* 3, 17.
- Snow P.J., Renshaw G.M.C., Hamlin K.E. 1996. Localization of enkephalin immunoreactivity in the spinal cord of the long-tailed ray *Himantura fai*. *J Comp Neurol.* 367, 264-273.
- Stewart A., Cachat J., Wong K., Gaikwad S., Gilder T., DiLeo J., Chang K., Utterback E.W., Kalueff A.V. 2010. Homebase behaviour of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behav Proc.* 85, 198–203.
- Terashima, S.-i. and Liang, Y.-F. (1994). C mechanical nociceptive neurons in the crotaline trigeminal ganglia. *Neurosci. Lett.* 179, 33-36.
- Tononi G., Edleman G.M., Sporns O., 1998. Complexity and coherency: integrating information in the brain. *Trends Cogn Sci.* 2, 474–484.
- Vallarino M. 1985. Occurrence of b-endorphin-like immunoreactivity in the brain of the teleosts, *Boops boops*. *Gen Comp Endocrinol.* 60, 63–69.
- Vargas J.P., Lopez J.C., Portavella M. 2009. What are the functions of fish brain pallium? *Brain Res Bull.* 79, 436–440.
- Vecino E., Ekstrom P., Sharma S.C. 1991. Enkephalin-like immunoreactive cells in the mesencephalic tegmentum project to the optic tectum in *Salmo gairdneri* and *Salmo salar*. *Cell Tissue Res.* 264, 133-137.
- Vecino E., Pinuela C., Arevalo R., Lara J., Alonso J.R., Aijon J. 1992. Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rainbow trout: An immunocytochemical study. *J Anat.* 180, 435-453.
- von der Emde, G. (1998). Electoreception. In *The Physiology of Fishes* (ed. D. H. Evans), pp. 313-343.
- Whitear M. 1983. The question of free nerve endings in the epidermis of lower vertebrates, *Acta Biol.Hung.* 34, 303–319.

Wild M. 2012. Fische. Kognition, Bewusstsein und Schmerz. Eine philosophische Perspektive.

Wong K., Elegante M., Bartels B., Elkhyat S., Tien D., Roy S., Goodspeed J., Suciú C., Tan J., Grimes C., Chung A., Rosenberg M., Gaikward S., Denmark A., Jacson A., Kadri F., Chung KM., Stewart A., Gilder T., Beeson E., Zapolsky I., Wu N., Cachat J., Kalueff A.V. 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). Behav Brain Res. 208, 450–457.

Wullimann M.F. 1998, The central nervous system. In: “The Physiology of Fishes”. In: Evans DH (ed.). The physiology of fishes. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 245–282.

Wullimann M.F., Müller T. 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behaviour. J Comp Neurol. 475, 143–162.

Wylie L.M., Gentle M.J. 1998. Feeding-induced tonic pain suppression in the chicken: Reversal by naloxone. Physiol Behav. 64, 27-30.

Yoshida, M. and Hirano, R. (2010). Effects of local anesthesia of the cerebellum on classical fear conditioning in goldfish. Behav. Brain Funct. 6, 20.

Young, R. F. (1977). Fiber spectrum of the trigeminal sensory root of frog, cat and man determined by electron microscopy. In Pain in the Trigeminal Region (ed. D. L. Anderson and B. Matthews), pp. 137-160.

Zimmerman M. 1986. Physiological mechanisms of pain and its treatment. Klinische Anaesthesiol Intensivtherap. 32, 1-19.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

ACVAA. (2017). Position statement: The treatment of pain in animals.

http://www.acvaa.org/docs/Pain_Treatment

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9F%CF%80%CE%B9%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AD%CF%82>

https://en.wikipedia.org/wiki/Pain_in_invertebrates

https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CF%85%CE%BC%CF%80%CE%B1%CE%B8%CE%B7%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C_%CE%BD%CE%B5%CF%85%

[CF%81%CE%B9%CE%BA%CF%8C_%CF%83%CF%8D%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1](#)

<https://www.cognifit.com/el/brain-parts>

<https://www.lifo.gr/now/tech-science/ponane-ta-psaria-min-biasteite-na-apantisete>

<https://ethosandempathy.org/2020/02/03/ponane-ta-psaria/>

<https://www.greekvegans.gr/ethics/psaria-ponos/>

<https://study.com/academy/lesson/osteichthyes-nervous-system.html>

<https://www.iatriko.gr/el/disease/neyralgia-tridymoy?cl=609>

