

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η επίδραση διαφορετικών αλατοτήτων στην ανάπτυξη του εντέρου
Dicentrarchus labrax»**

Μαμάη Πολυξένη

Βόλος, 2022

**«Η επίδραση διαφορετικών αλατοτήτων στην ανάπτυξη του εντέρου
Dicentrarchus labrax»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Βερίλλης Παναγιώτης**
- 2) Γκολομάζου Ελένη**
- 3) Μεντέ Ελένη**

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από την κα. Γκολομάζου Ελένη και την κα. Μεντέ Ελένη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να τον συμφοιτητή μου Νικόλαο Γκάγκαρη για την συνεργασία μας, κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	1
1.1 Dicentrarchus labrax, λαβράκι.....	1
1.2 Αλατότητα – Ωσμωτική Ρύθμιση των τελεοστέων.....	3
1.3.1 Η λειτουργία και η ανατομία του εντέρου.....	5
1.3.2 Η ιστολογική δομή του εντέρου.....	7
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	9
2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....	9
2.2 Μονιμοποίηση ιστών.....	9
2.3 Αφυδάτωση και διαύγαση.....	10
2.4 Σκλήνωση.....	12
2.5 Λήψη τομών.....	15
2.6 Χρώση και επικόλληση.....	17
2.7 Ιστολογική Αρίθμηση.....	20
2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	21
3. Αποτελέσματα.....	22
3.1 Στατιστικά αποτελέσματα.....	22
3.2 Ιστολογικά αποτελέσματα.....	32
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	38
5. Βιβλιογραφία.....	41

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός αυτής της έρευνας, είναι η διερεύνηση της επίδρασης που μπορεί να έχουν διαφορετικές αλατότητες των 8, 14, 20 ppt, στην ιστολογική δομή και ανάπτυξη του εντέρου του είδους *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), υπό βέλτιστες συνθήκες, με σταθερή θερμοκρασία. Η επιλογή του συγκεκριμένου οργάνου έγινε για τους λόγους επιρροής που έχει συνολικά, στην ανάπτυξη του ψαριού, μέσω της απορρόφησης θρεπτικών και την μελέτη της ωσμωρύθμισης σε εκείνο το επίπεδο. Το αντίκτυπο αυτής της μελέτης συνεισφέρει στη βιβλιογραφία της επιστημονικής έρευνας που ήδη υπάρχει και προτρέπει την περαιτέρω εξέταση τέτοιων συνθηκών ως προς το έντερο και άλλων οργάνων, για την ανάπτυξη ενός βέλτιστου συστήματος εκτροφής του είδους, είτε σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, είτε σε υδροπονικά συστήματα, καθώς είναι είδος μεγάλης εμπορικής αξίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) ως ένα ευρύαλο, ευρύθερμο είδος ψαριού έχει τη δυνατότητα να ανταπεξέρχεται σε διάφορες περιβαλλοντολογικές συνθήκες, αλλά δεν υπάρχει αρκετή πληροφόρηση ως προς το πώς η αλατότητα μεταβάλλει την ιστολογία του εντέρου και πώς μπορεί να επηρεάζονται οι λειτουργίες του, ειδικότερα όταν τα υπόλοιπα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά είναι σταθερά. Συγκεκριμένα, σε αυτήν την μελέτη έγινε εκτροφή ατόμων λαβρακίου σε τρεις διαφορετικές δεξαμενές, που η κάθε μια είχε διαφορετική αλατότητα των 8,14,20 για 60 ημέρες. Από την κάθε δεξαμενή συλλέχθηκαν 15 άτομα (συνολικά 45), όπου ακολουθήθηκε η διαδικασία παρασκευής δειγμάτων και η ιστολογική παρατήρηση τους. Τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς την γενικότερη μορφολογία του εντέρου, ως προς το εμβαδόν, το μήκος της εντερικής λάχνας και τον αριθμό των goblet cell/εντερική λάχνα, με σκοπό την μεταξύ τους σύγκριση με στατιστική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως καμία από τις ομάδες δεν εμφάνισε οποιαδήποτε ιστοπαθολογική κατάσταση και όλα τα δείγματα εντέρου είχαν φυσιολογική δομή. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορές στις 3 ομάδες, ως προς τις μελετώμενες παραμέτρους, με τις οποίες έγινε περαιτέρω σύγκριση με άλλες παρόμοιες μελέτες, για να πιστοποιηθεί η εγκυρότητα της έρευνας, αλλά και για την ανάπτυξη εποικοδομητικής ανάλυσης των πιθανών αιτίων αυτών των διαφορών.

Λέξεις κλειδιά: *Dicentrarchus labrax*, έντερο, ιστολογία, goblet cell, αλατότητα.

1. Εισαγωγή

1.1.1 Λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (L.)

Το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758) (*D. labrax*) είναι ένα ευρύαλο και ευρύθερμο είδος θαλασσινού ψαριού, δηλαδή έχει την ικανότητα να επιβιώνει, να αναπτύσσεται και να αναπαράγεται σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας και θερμοκρασίας (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, 2015). Η ανεκτικότητα του στην αλατότητα φθάνει μέχρι και 60ppt, ενώ όσον αφορά το θερμοκρασιακό εύρος από 5 έως 32 °C (Volckaert F., et al, 2008). Τα χαρακτηριστικά αυτά, του προσφέρουν την δυνατότητα να μεταναστεύει σε ρηχότερα νερά, σε παράκτιες περιοχές, εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες ή να εισέρχεται σε μεγαλύτερη βάθη με πιο κρύα νερά, ανάλογα τις βιολογικές του ανάγκες. Συναντάται σε βιότοπους υποτροπικής ζώνης, ζει στην περιοχή της υφαλοκρηπίδας έως τα 200 m βάθος, καθώς είναι ένα βενθικό είδος (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, 2015). Βρίσκεται συνήθως, στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού (περιοχή της Μεγάλης Βρετανίας, Ιρλανδίας), ενώ είναι ένα κοινό είδος της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Είναι ένα σαρκοφάγο αρπακτικό ψάρι, όπου τρέφεται μεγάλη ποικιλία ψαριών της οικογένειας *Clupidae*, άλλα μικρότερα κοπαδιάρικα ψάρια και με διάφορα κεφαλόποδα, οστρακοειδή (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, 2015). Από θρεπτικής άποψης, είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο για τον ανθρώπινο οργανισμό, έτσι, σε συνδυασμό με την ανοχή του σε διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και περιβάλλοντα, βρίσκεται στο επίκεντρο της προσοχής των καταναλωτών και των ιχθυοκαλλιεργητών (Volckaert F., et al, 2008).



Εικόνα 1.1 Εξωτερική μορφολογία ενήλικου λαβρακίου, *Dicentrarchus labrax*, Πηγή: Fishbase, Dammous, Shibl - 28.04.01

1.1.2 Ταξινόμηση και Κατάταξη

Ταξινόμηση και κατάταξη (Barnabée, 1978)

i. Ταξινόμηση

Πίνακας 1.1.1 Ταξινόμηση και κοινά ονόματα που χρησιμοποιούνται για το είδος.

Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)
Συνώνυμα: <i>Morone labrax</i> , Boulenger, 1895, <i>Labrax lupus</i> , Cuvier, 1828
Κοινά ονόματα: European seabass (En), Bar common (Fr), Branzino (It), Lubina (Sp).

ii. Κατάταξη

Πίνακας 1.1.2 Συστηματική κατάταξη του είδους.

Υπερκλάση	Ιχθύες
Κλάση	Οστεϊχθύες
Ανθυπόκλαση	Τελεόστεοι
Τάξη	Περκόμορφα
Οικογένεια	Μορονίδες

1.2 Αλατότητα - Ωσμωτική ρύθμιση των τελεοστέων

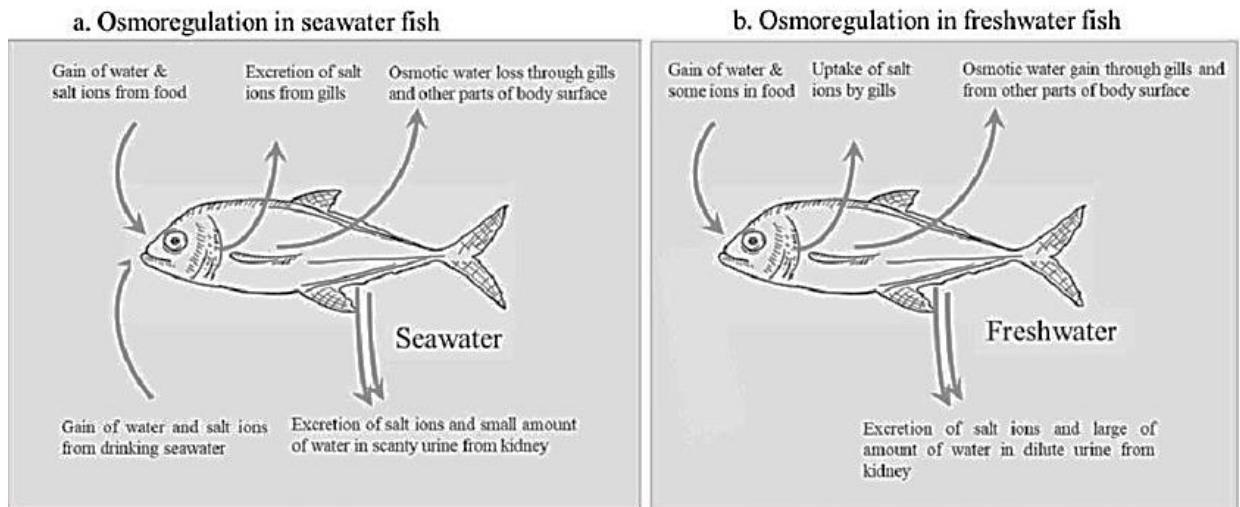
Η αλατότητα αποτελεί έναν φυσικό παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τους οργανισμούς που βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον. Τα άλατα αποτελούν τα κυριότερα συστατικά που είναι διαλυμένα στο νερό (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, Νικόλαος Χ. Νεοφύτου,2015). Η μεταβολή αυτής της παραμέτρου, προκαλεί αλλαγή της φυσικοχημικής κατάστασης του νερού, η οποία έχει το ανάλογο αντίκτυπο στους υδρόβιους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα η αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας που απαιτείται για την ωσμωρύθμιση, από τους Οστεϊχθύες (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, Νικόλαος Χ. Νεοφύτου,2015).

Η αλατότητα επηρεάζεται με την μεταβολή της θερμοκρασίας, καθώς είναι ένας από τους σημαντικότερους αβιοτικούς παράγοντες. Παρατηρείται, πως στις περιοχές που υφίστανται μεγάλες εξατμίσεις, λόγω υψηλών θερμοκρασιών, ή περιοχές όπου κρυσταλλοποιείται το νερό σε πάγο , εμφανίζεται αύξηση της αλατότητας (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, Νικόλαος Χ. Νεοφύτου, 2015). Επομένως, πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι

επιπτώσεις που προέρχονται από αυτές τις μεταβολές, ιδιαζόντως από τις Μεσογειακές χώρες, που βασίζονται οικονομικά στην εκτροφή του είδους. Από φυσιολογική και βιολογική άποψη, η αλατότητα διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην επιβίωση των οστεϊχθύν του θαλασσινού νερού, καθώς επηρεάζει τους μηχανισμούς ωσμωτικής πίεσης και διάχυσης (Masroor W., et al., 2018). Ακόμη, η μίξη των νερών σε εκβολές ποταμών ή περιοχές παλιρροιών επηρεάζει τους οργανισμούς, σε επίπεδο διάχυσης και ώσμωσης, λόγω των διαφορετικών αλατοτήτων (Χρίστος Ν. Νεοφύτου, Νικόλαος Χ. Νεοφύτου, 2015). Η απορροφητικότητα της τροφής επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα ψάρια, ειδικότερα όταν προσαρμόζονται από θαλασσινό σε γλυκό νερό (Eroldogan et al., 2004), το οποίο ουσιαστικά, έχει αντίκτυπο στα όργανα τα οποία είναι υπεύθυνα για αυτή τη διαδικασία.

Η ωσμωρύθμιση στα ψάρια πραγματοποιείται μέσω ρύθμισης ιόντων και νερού σε διαφορετικά σημεία του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των οστών, των βράγχια, των νεφρών και του εντέρου. Η ρύθμιση των ιόντων ελέγχεται από ιοντοκύτταρα όπου το ένζυμο $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NKA) είναι άφθοно (Evans, 2009). Γενικότερα, οι θαλάσσιοι οστεϊχθύες, όπως το λαβράκι, διατηρούν τα υγρά του σώματος τους πιο συμπυκνωμένα από το περιβάλλον θαλασσινό νερό (υπερωσμωτικοί ρυθμιστές), ειδικότερα όταν βρίσκονται σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας. Για την αντιστάθμιση της απώλειας νερού, πίνουν συνεχώς νερό από το περιβάλλον τους (Hickman P. Cleveland, et al, 2014).

Συγκεκριμένα, στο στόμαχο απορροφάται παθητικά το χλωριούχο νάτριο (NaCl), από το θαλασσινό νερό που έχει καταποθεί, ενώ ενεργά εκκρίνεται από τα βράγχια μέσω του αίματος, μαζί με άλλα άλατα. Στο έντερο, όπου συνεχίζεται η ωσμωτική ρύθμιση, τα ιόντα που παραμένουν εκεί, συγκεκριμένα το ασβέστιο, το μαγνήσιο και τα θειικά αποβάλλονται μέσω περιττωμάτων ή ουρίας από την έδρα (Hickman P. Cleveland, et al, 2014). Τα ψάρια αλμυρού νερού γνωρίζουν ακριβώς πόση ποσότητα νερού πρέπει να καταναλώσουν για να αντικαταστήσουν την απώλεια του και με αυτόν τον τρόπο της ωσμωτικής – ιοντικής ρύθμισης, απαλλάσσονται από τα περίσσεια θαλασσινά άλατα (Hickman P. Cleveland, et al, 2014).



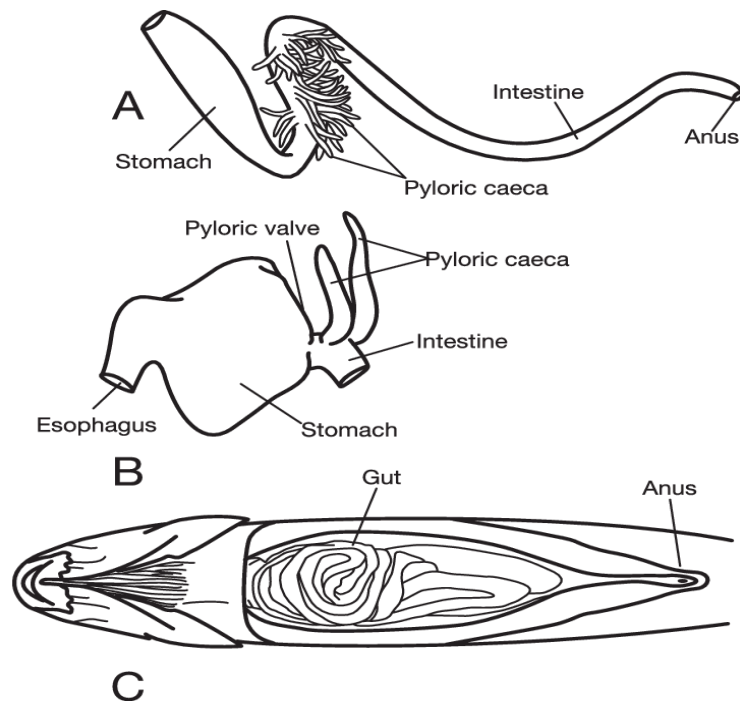
Εικόνα 1.2 Η διαδικασία της οσμωτικής ρύθμισης των οστειχθύων α) σε θαλασσινό νερό και β) σε γλυκό νερό. Πηγή: Physiology of Threespined Sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, of the Camargue at different salinities - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/13-Process-of-osmoregulation-a-in-seawater-and-b-in-freshwater-fish_fig12_331889279 [accessed 20 Apr , 2022]

1.3.1 Η λειτουργία και η ανατομία του εντέρου

Στους τελεοστέους οστειχθύες, το πεπτικό σύστημα περιλαμβάνει την στοματική κοιλότητα – φάρυγγα , τον οισοφάγο, τον στόμαχο, τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο. Αυτό το σύστημα οργάνων εμπεριέχει βασικές διαδικασίες τεμαχισμού, πέψης και απορρόφησης της τροφής, όπου στη συνέχεια, το απεκκριτικό σύστημα αποβάλλει τις περιττές ή βλαβερές ουσίες. Συγκεκριμένα, το έντερο είναι συνέχεια του στομάχου και το μήκος του ποικίλλει ανάλογα τις διατροφικές συνήθειες, την ηλικία και το είδος (Παπουτσόγλου,2008). Ανάλογα το είδος και αντίστοιχα της φυσιολογίας θρέψης του, υπάρχει αλλαγή στην μορφολογία του εντέρου, πχ. τα φυτοφάγα ψάρια έχουν εκτεταμένο μήκος εντέρου, σε αντίθεση με τα σαρκοφάγα όπου είναι μικρότερο. Το έντερο του *D.labrax* είναι βραχύ και ευθύ και δεν διακρίνεται εύκολα η διαφορά μεταξύ λεπτού και παχέος εντέρου. Σύμφωνα με μερικούς συγγραφείς, το έντερο μπορεί να διακριθεί σε 4

τιμήματα, με βάση τις φυσιολογικές λειτουργίες του: α) το πρόσθιο μέρος (διογκωμένο τμήμα του εντέρου μέχρι της είσοδο του αγωγού της χολής), β) το κεντρικό μέρος του μεσεντέριου, γ) το ακραίο τμήμα μεσεντέριου και το δ) ορθό έντερο ή τελικό μέρος (μέχρι την έδρα) (Π. Βερίλλης, Ε. Μεντέ 2017).

Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου συνδέεται με τα πυλωρικά τυφλά (ως προέκταση του πρώτου), όπου αυτά τα δύο όργανα παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς την ιστολογική δομή και λειτουργία τους (John E. Halver & Ronald W. Hardy, 2002). Η λειτουργία τους αφορά την συνέχιση της διαδικασίας της πέψης, η οποία ξεκινάει από τον στόμαχο και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών που απελευθερώνονται από την τροφή που υπόκειται σε πέψη (John E. Halver & Ronald W. Hardy, 2002). Το έντερο εμπεριέχει διάφορα είδη κυττάρων, κάποια από τα οποία εκκρίνουν βλέννα, πεπτικά ένζυμα ή ορμόνες που βοηθούν στην ρύθμιση της πέψης και κάποια άλλα που βασικός τους ρόλος είναι η απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών (Bjorgen H., et al, 2020). Ωστόσο, από το πρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα του εντέρου, μειώνεται η εκκριτική και απορροφητική λειτουργία. Εξίσου σημαντική λειτουργία του εντέρου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι η ωσμωρύθμιση, όπου πραγματοποιείται στο επιθήλιο του εντέρου (David W. & Groman B., 1982).

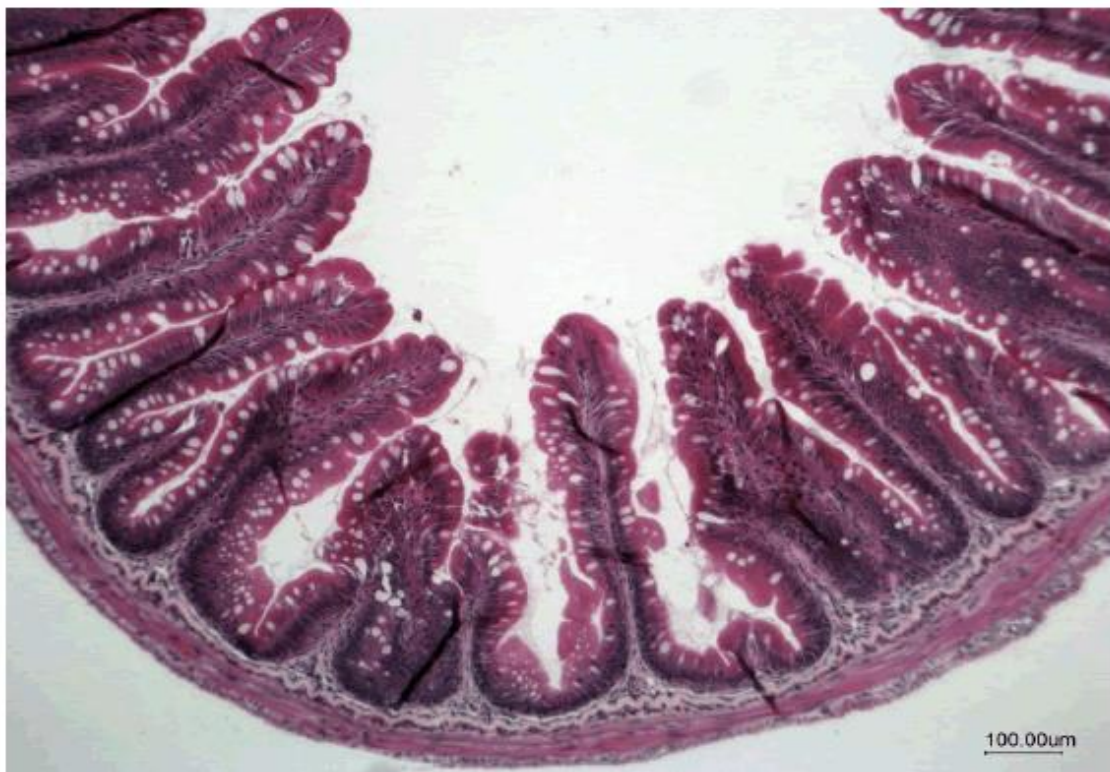


Εικόνα 1.3.1 Απεικόνιση πεπτικού συστήματος τελεοστέου ιχθύος. Α) ανατομία των σαρκοφάγων και παμφάγων ειδών, Β) ανατομία των φυτοφάγων και παρασιτοφάγων ιχθύων, C) εγκάρσια τομή ιχθύος όπου διακρίνεται το έντερο και η έδρα. Πηγή: https://www.researchgate.net/publication/275212136_Diets_and_energy_flow by James Edward Garvey

1.3.2 Η ιστολογική δομή του εντέρου

Το έντερο ενός φυσιολογικού λαβρακίου, περιέχει εντερικές λάχνες που αποτελούνται από επιθήλιο και χιτώνα συνδετικού ιστού, ενώ περιέχουν τριχοειδή αγγεία αίματος και λέμφου. Το εντερικό επιθήλιο περιέχει εντεροκύτταρα που διαθέτουν ψυκτροειδή παρυφή (μικρολάχνες) και βλεννογόνα κύτταρα (goblet cells) (Genten et al. ,2009). Τα βλεννογόνα κύτταρα είναι διασκορπισμένα ανάμεσα στα εντεροκύτταρα των λαχνών και ο αριθμός τους αυξάνεται προς την έδρα (Π. Βερίλλης, Ε. Μεντέ 2017). Ο μυϊκός χιτώνας του εντέρου αποτελείται από δύο στρώματα, το έσω κυκλωτερές στρώμα και το έξω

επίμηκες στρώμα μυϊκών ινών, τα οποία καλύπτονται από τον ορογόνο χιτώνα (εξωτερική στιβάδα εντέρου). Αμέσως μετά τις δύο στιβάδες υπάρχει ένας υποβλεννογόνος χιτώνας, που αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, που περιέχει αιμοφόρα αγγεία και πορευτικά κύτταρα. Οι εντερικές λάχνες αποτελούνται από το χόριο βλεννογόνου και το επιθήλιο του βλεννογόνου (εντερικό επιθήλιο) (John E. Halver & Ronald W. Hardy, 2002; David W. & Groman B. 1982; Π. Βερίλλης, Ε. Μεντέ 2017).



Εικόνα 1.3.2 Λεπτομέρεια ιστολογικής τομής φυσιολογικού εντέρου ενήλικου ατόμου Rainbow trout, όπου διακρίνεται η δομή του και πληθώρα goblet cells, με χρώση Ηωσίνης – Αιμοτοξυλίνης. Scale bar= 100 μm, Πηγή: Panagiotis Berillis and Eleni Mente, Histology of Goblet Cells in the Intestine of the Rainbow Trout Can Lead to Improvement of the Feeding Management (2017) Volume 11, Issue 4, Journal of FisheriesSciences.com

2. Μέθοδοι και Υλικά

Η παρούσα έρευνα αποτελείται από ιστολογικά παρασκευάσματα, τα οποία δημιουργήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης διαφορετικών αλατοτήτων στην ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα (έντερο) του εκτρεφόμενου είδους *Dicentrarchus labrax* υπό βέλτιστες συνθήκες. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών, όπου σε τρεις δεξαμενές με διαφορετικές αλατότητες 8, 14 , 20 εκτρέφονταν νεαρά άτομα λαβρακίου για 60 ημέρες. Οι ομάδες από τις δεξαμενές ονομάστηκαν αντίστοιχα Δ8, Δ14, Δ20. Από κάθε δεξαμενή, με τυχαία δειγματοληψία, συλλέχθηκαν 15 άτομα από κάθε δεξαμενή, δηλαδή συνολικά 45 ψάρια. Για την ιστολογική μελέτη και την παρασκευή των δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες, που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο ιστολογίας του τμήματος.

2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Συλλογή, καταγραφή (ιστορικού του κάθε ατόμου), ταξινόμηση και μακροσκοπική εξέταση του κάθε δείγματος. Οι ιχθύς θυσιάστηκαν με υπερδοσολογία αναισθητικής ουσίας μεθανοσουλφονικής τρικαΐνης (MS222), σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές νομοθεσίες. Νεκροτομή και συλλογή ιστού, τοποθέτηση αμέσως σε μονιμοποιητική ουσία.

2.2 Μονιμοποίηση ιστών

Από τα ψάρια λήφθηκαν τομές εντέρου 3-4 mm σε πάχος και τοποθετήθηκαν σε μονιμοποιητικό υγρό 10% ουδέτερης ρυθμισμένης φορμόλης, όπου παρέμειναν εκεί μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.



Εικόνα 2.2 Λήψη τομών και τοποθέτηση τους σε κασέτα. Πάνω αριστερά είναι τα δείγματα στο μονιποιητικό υγρό. Προετοιμασία για τη διαδικασία της ιστοκινέτας. (Προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).

2.3 Αφυδάτωση και διαύγαση

Τα στάδια της αφυδάτωσης και διαύγασης έγιναν με την αυτοματοποιημένη μέθοδο της ιστοκινέτας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Leica TP 1020 σε πρόγραμμα 5 (Prog5) όπου τηρήθηκαν τα εξής βήματα:

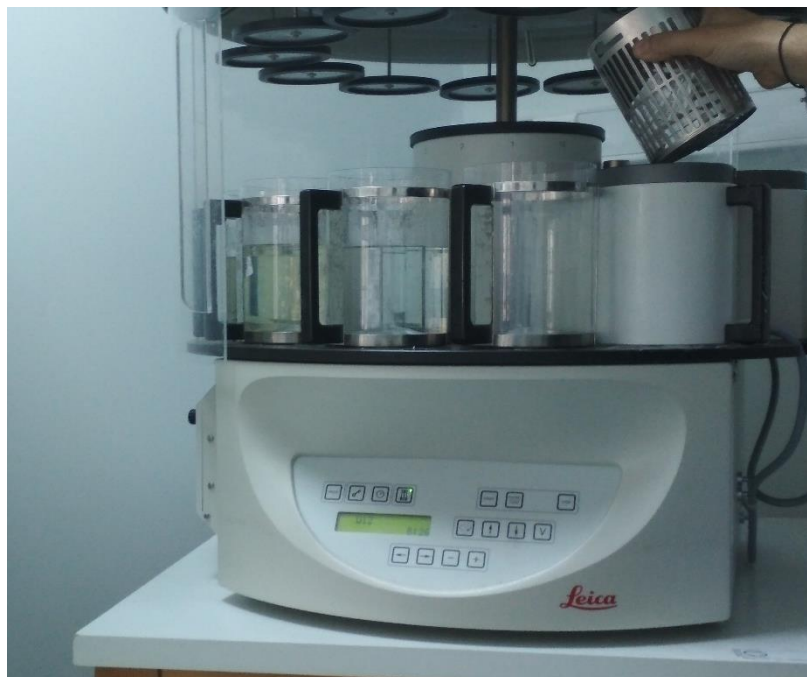
1. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε κασετίνες και προσωρινή τοποθέτηση σε ένα δοχείο ιστοκινέτας με φορμολή 10%, μέχρι να ολοκληρωθούν όλες οι κασετίνες.
2. Στο μηχάνημα της ιστοκινέτας το πρώτο δοχείο αφέθηκε κενό.
3. Έγινε έλεγχος παραφίνης και συμπλήρωση του δοχείου.

4. Στα υπόλοιπα δοχεία μπήκαν με αριθμητική σειρά τα εξής υγρά (Αιθανόλη, Αλκοόλη, Ξυλόλη):

- Αιθανόλη 70% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 80% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 95% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 95% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 100% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 100% για 1 ώρα.
- Αιθανόλη 100% για 2 ώρες.
- Ξυλόλη για 2 ώρες.
- Ξυλόλη για 2 ώρες.
- Παραφίνη για 2 ώρες.
- Παραφίνη για 4 ώρες.

Συνολικά η διαδικασία της ιστοκινέτας πραγματοποιήθηκε σε 19 ώρες.

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας της ιστοκινέτας, αφαιρείται το νερό από τα δείγματα μέσω υδατικού διαλύματος οινόπνεύματος ανιούσας σειράς συγκεντρώσεως αλκοολικών βαθμών. Ενώ, η επίδραση της ξυλόλης, η οποία αναμείχθηκε με την παραφίνη, κατέστησε τα δείγματα διαυγή. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, το καλάθι με τα ιστολογικά δείγματα αφέθηκε για στράγγισή.



Εικόνα 2.3 Μηχάνημα ιστοκινέτας. Τοποθέτηση του καλαθιού με τα ιστολογικά δείγματα. Εργαστήριο ιστολογίας, προσωπικό αρχείο, (Μαμάη Πολυξένη, 2021).

2.4 Σκλήνωση

Με σκοπό τα επιμέρους στοιχεία των δειγμάτων να διακρίνονται μεταξύ τους, τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο μέσο εγκλεισμού (σκήνωσης), έτσι ώστε, αργότερα να κοπούν σε λεπτές τομές. Το μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν η παραφίνη, στους 60-61°C. Εμβαπτίστηκαν σε τηγμένη παραφίνη πάνω σε μεταλλικά κουπάκια ανάλογα του μεγέθους δείγματος, μέσω ειδικού μηχανήματος σκήνωσης, ενώ μετά την ολοκλήρωση εγκλεισμού της κάθε κασετίνας, τοποθετήθηκαν πάνω σε ψυχόμενη πλάκα για την πλήρη πήξη της παραφίνης. Έπειτα, αφαιρέθηκαν τα κουπάκια και αποθηκεύτηκαν μέχρι το επόμενο στάδιο. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την σκήνωση είναι το Leica EG 1150 H και του κρυοστάτη Leica EG 1150 C.



Εικόνα 2.4.1 Μηχάνημα σκλήνωσης, διαδικασία εμφάνισης με παραφίνη. (Προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).



Εικόνα 2.4.2 Μηχάνημα κρυστάτη . (Προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη,2021).



Εικόνα 2.4.3 Αποθήκευση ιστοτεμαχίων. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).

2.5 Λήψη Τομών

Για την λήψη τομών από τα ιστοτεμάχια, πρώτα αφαιρέθηκε η περίσσεια παραφίνης από τις κασέτες και έπειτα μεταφέρθηκαν στο όργανο κοπής, τον μικροτόμο (SLEE MAINZ CUT 5062). Οι κύβοι παραφίνης ήταν κατεψυγμένοι, για την διευκόλυνση της κοπής. Τα δείγματα κόπηκαν κατά καθορισμένα ίσα διαστήματα μήκους, σταθερού πάχους των 5μm. Μετά από κάθε λήψη τομών, οι τομές απλώνονταν για 1 λεπτό σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους 40°C ώστε να απλώσουν και επιτόπου ακολουθήθηκε η επίστρωση των τομών, σε ξηρές αντικειμενοφόρες πλάκες. Αμέσως μετά, στραγγίστηκαν σε χαρτί και αφέθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα για την αποπαραφίνωση των τομών. Η κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα ήταν σημασμένη με τους αντίστοιχους κωδικούς του κάθε δείγματος.



Εικόνα 2.5.1 Μικροτόμος που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη ιστολογικών τομών. Πηγή: <https://www.biriden.com/images/properties/pdfs/312/cut-5062-englisch.pdf>



Εικόνα 2.5.2 Θερμαινόμενο υδατόλουτρο όπου απλώνονταν οι τομές. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).



Εικόνα 2.5.3. Θερμαινόμενη πλάκα με ιστολογικά δείγματα. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).

2.6 Χρώση και Επικόλληση

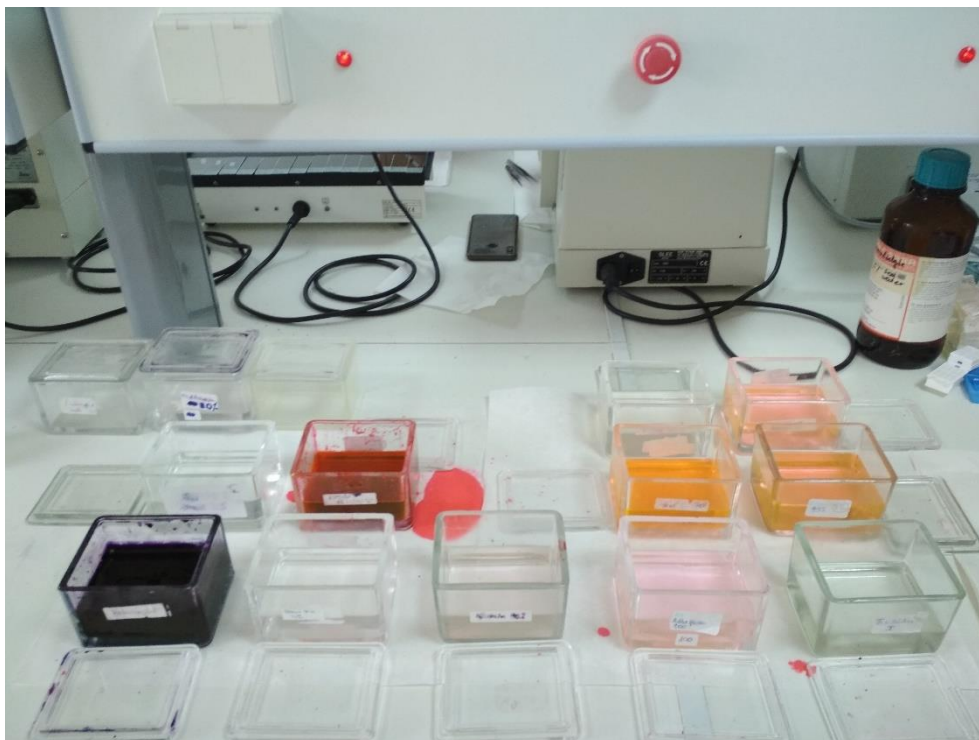
Για την χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι υδατοδιαλυτές χρωστικές Αιμοτοξυλίνη – Ηωσίνη. Τα δείγματα ανά 10 τοποθετήθηκαν σε ειδικό σκεύος το οποίο εξυπηρετεί στην διήθηση τους στο κάθε βαζάκι με τα υγρά. Αρχικά, αφαιρείται η παραφίνη από την τομή, έπειτα ενυδατώνεται και τέλος χρωματίζεται. Μετά την χρώση επακολουθεί εκ νέου αφυδάτωση ώστε να καταστούν διαυγή τα δείγματα. Τηρήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Ξυλόλη I για 15 λεπτά.
2. Ξυλόλη II για 15 λεπτά.
3. Αλκοόλη 100% για 5 λεπτά.
4. Αλκοόλη 100% για 5 λεπτά.
5. Αλκοόλη 95% για 5 λεπτά.
6. Αλκοόλη 95% για 5 λεπτά.
7. Αλκοόλη 75% για 5 λεπτά.

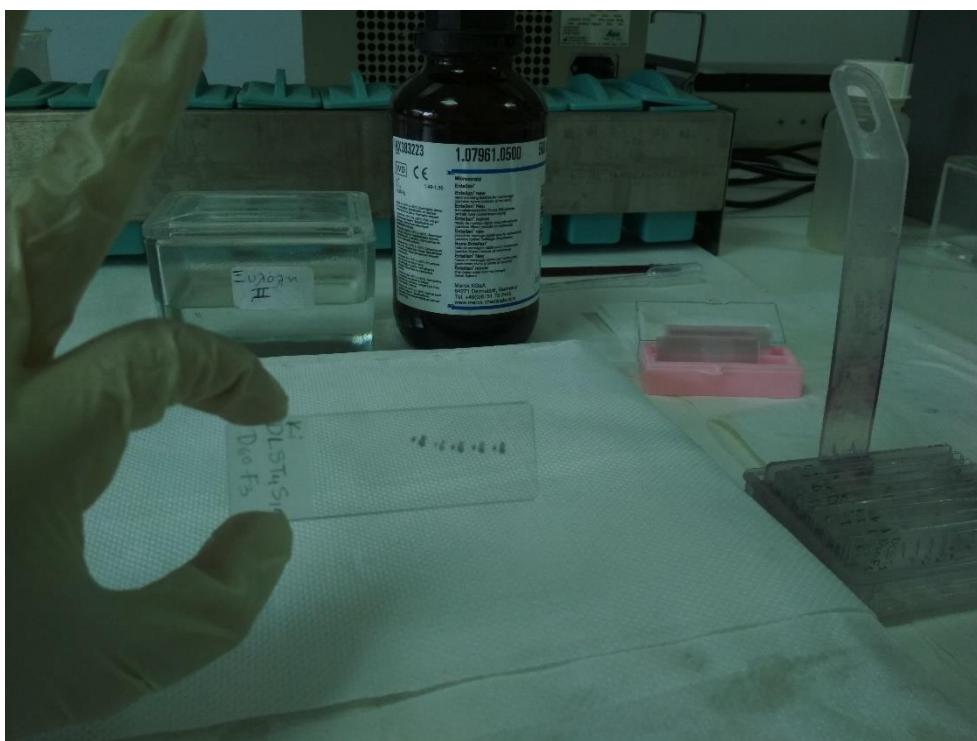
8. Διήθηση σε νερό βρύσης για 2 λεπτά.
9. Αιμοτοξυλίνη για 7 λεπτά.
10. Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 λεπτά.
11. Διάλυμα διαφοροποίησης (acid alcohol) μόνο 2 εμβαπτίσεις.
12. Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 λεπτά.
13. Ηωσίνη για 3 λεπτά.
14. Συνεχόμενες εμβαπτίσεις σε δοχείο με νερό βρύσης για 30 δευτερόλεπτα.
15. Αλκοόλη 70% για 1 λεπτό.
16. Αλκοόλη 95% για 1 λεπτό.
17. Αλκοόλη 95% για 1 λεπτό.
18. Αλκοόλη 100% για 1 λεπτό.
19. Αλκοόλη 100% για 1 λεπτό.
20. Ξυλόλη για 15 λεπτά.

Εν συνέχεια, έγινε επικάλυψη των τομών με DPX και τοποθετήθηκαν οι καλυπτρίδες. Αποθηκευτήκαν με αριθμητική σειρά σε ειδική κασετίνα οι ομάδες A, B, C αντίστοιχα των δεξαμενών Δ8, Δ14, Δ20, με A τα δείγματα που πάρθηκαν από την δεξαμενή Δ8 και ούτω καθεξής.

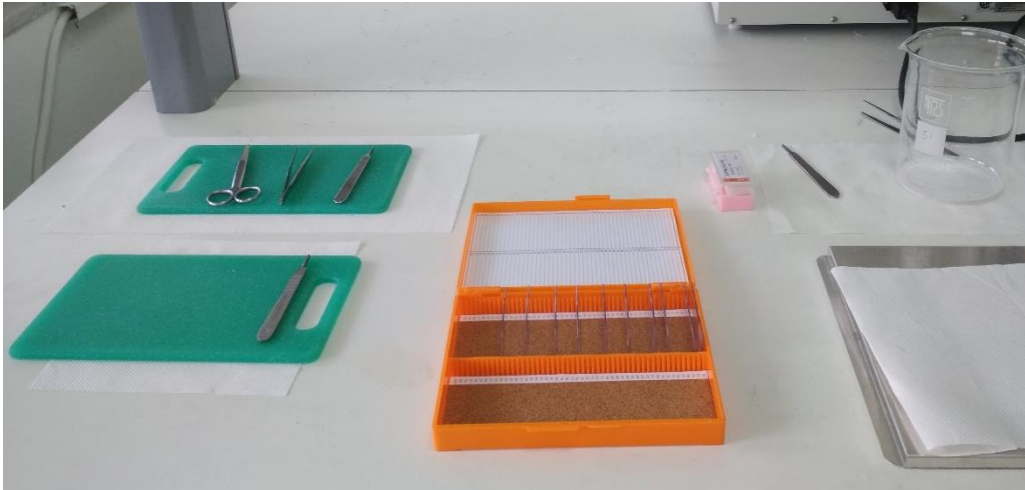
Για την παρατήρηση τους χρησιμοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο Zeiss Axiostar Plus και φωτογραφήθηκαν με κάμερα Jenoptik Pro στο πρόγραμμα ProgRes Capture Pro Version. Όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε φακό μεγέθους 10x και 40x, ενώ αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα ImageJ version 1.53s όπου τα pixels της κάθε λήψης, αναπαραστάθηκαν σε 8-bit color (256 χρώματα έγχρωμο) triple values, σε κλίμακα των 1,99 pixel/μm (2592x1944 pixels , 200μm). Ο αριθμός των δεδομένων / μετρήσεων που πάρθηκαν είναι αντιπροσωπευτικός του αριθμού των δειγμάτων, για κάθε δεξαμενή ξεχωριστά.



Εικόνα 2.6.1 Διαδικασία χρώσης, τα δοχεία με όλα τα υγρά. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).



Εικόνα 2.6.2 Επικόλληση αντικειμενοφόρους πλάκας με DPX και τοποθέτηση καλυπτρίδας. Δεξιά διακρίνεται το σκεύος που χρησιμοποιήθηκε για την διήθηση κατά τη διαδικασία της χρώσης. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).



Εικόνα 2.6.3 Κασετίνα αποθήκευσης δειγμάτων. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη,2021)



Εικόνα 2.6.4 Δείγματα με τους κωδικούς σήμανσης, αφού ολοκληρώθηκαν όλες οι διαδικασίες παρασκευής και χρώσης. (προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη, 2021).

2.7 Ιστολογική - Αριθμητική ανάλυση

Έγινε συνολικός έλεγχος της μορφολογίας του κάθε ιστολογικού δείγματος, όπου εξετάστηκε η κατάσταση όλων των στιβάδων εντέρου ,μετρήθηκε το εμβαδόν, το μήκος της κάθε λάχνας, ενώ ελέγχθηκε και η ύπαρξη ή μη ψυκτροειδούς παρυφής στον βλεννογόνο του επιθήλιου. Εντοπίστηκαν εντεροκύτταρα και βλεννοπαράγωγα κύτταρα (goblet cells). Επίσης, ελέγχθηκε η ύπαρξη ή μη λιποσταγονιδίων. Από το κάθε δείγμα, λήφθηκαν 1-3 μετρήσεις, ανάλογα την ποιότητα του δείγματος, διατηρώντας έναν

συνολικό αριθμό 45 μετρήσεων ανά ομάδα αλατότητας, ώστε να διευκολυνθεί η στατιστική ανάλυση και η σύγκριση των εν λόγω δεδομένων. Όλα τα δεδομένα που πάρθηκαν ήταν σε μm, σύμφωνα με τις μετατροπή του scale bar/ pixels που αναφέρθηκε παραπάνω. Οι πιθανές ιστολογικές βλάβες βαθμοθετήθηκαν με βάση την σοβαρότητα με το εξής σύστημα: Grade 0 (όχι αξιοσημείωτη), Grade 1 (ελάχιστες), Grade 2 (ήπιες), Grade 3 (μέτριες), Grade 4 (σοβαρές).

2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, με το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics version 28.0, στις μετρήσεις που πάρθηκαν κατά την ιστολογική ανάλυση των δεδομένων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή μέσων \pm τυπικό σφάλμα μέσων (S.E.M.) για όσα είχαν κανονική κατανομή και με median \pm interquartile range για αυτά που δεν είχαν. Ελέγχθηκαν για κανονική κατανομή και ομοιογένεια, μέσω Kolmogorov – Smirnov (n=135) $p > 0.05$, Q-Q Plot, Levene's test και παραστατικά με ιστογράμματα, Q-Q plots. Για να καθοριστεί οποιαδήποτε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ανεξάρτητων ομάδων για κάθε εξαρτημένη παράμετρο, στις διαφορετικές βαθμίδες των αλατοτήτων 8,14,20, εφαρμόστηκε one-way ANOVA $p < 0.05$ στο εμβαδόν και στο μήκος, ακολουθούμενη από Dunnett T3 post-hoc test $p < 0.05$ για το εμβαδόν και Turkey's post-hoc test για το μήκος με $p < 0.05$. Ενώ, για την σύγκριση των ομάδων που αφορούσαν την καταμέτρηση των goblet cell/εντερική λάχνα χρησιμοποιήθηκε Mann-Whitney test.

3. Αποτελέσματα

3.1 Στατιστικά Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα όσον αφορά το εμβαδόν (μm^2) της κάθε εντερικής λάχνας και το μήκος (μm) της, δεν διαφέρουν σημαντικά από μια κανονική κατανομή για κάθε περίπτωση αλατότητας που ελέγχθηκε (των 8ppt, 14 ppt, 20ppt), με $p > 0.05$, ενώ τα αποτελέσματα των καταμετρημένων goblet cell/εντερική λάχνα διαφέρουν από μια κανονική κατανομή, $p < 0.05$. (Πίνακας 3.1.3). Ο μέσος \pm η τυπική απόκλιση (mean value \pm std. error) για $\Delta 8$ ως προς το εμβαδόν ήταν $1759,18 \pm 1,66 \mu\text{m}^2$ και ως προς το μήκος $719,81 \pm 0,19 \mu\text{m}$. Για την $\Delta 14$, το εμβαδόν ήταν $2262,85 \pm 12,5 \mu\text{m}^2$, ως προς το μήκος $809,9 \pm 0,10 \mu\text{m}$. Αντίστοιχα, για την $\Delta 20$ το εμβαδόν ήταν $1774,34 \pm 19,1 \mu\text{m}^2$ και το μήκος $760,06 \pm 0,73 \mu\text{m}$. Τα goblet cell λόγω έλλειψης κανονικής κατανομής δίνονται με median \pm interquartile range (IQR). Έτσι, λοιπόν, τα goblet cell/εντερ. λάχνα για την $\Delta 8$ είναι 9 ± 3 , για την $\Delta 14$ είναι 5 ± 6 και για την $\Delta 20$ είναι 10 ± 5 . Ακολουθούν ιστογράμματα και Q-Q plots, ως προς τα θεωρητικά ποσοστημόρια της κανονικής κατανομής, για όλα τα επιμέρους στοιχεία.

Πίνακας 3.1.1 Η επίδραση διαφορετικών αλατοτήτων για τις μετρήσεις των εντερικών λαχνών. Τα δεδομένα δίνονται με τη μορφή means \pm S.E. Διακρίνεται η στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων, με τις στήλες που έχουν τον ίδιο αστερίσκο να μην διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, $p < 0.05$

Αλατότητα	Εμβαδόν εντερικής λάχνας μm^2	Μήκος εντερικής λάχνας μm
8	$1759,18^a \pm 1,66$	$719,81^a \pm 0,19$
14	$2262,85^b \pm 12,5$	$809,9^b \pm 0,10$
20	$1774,34^a \pm 19,1$	$760,06^c \pm 0,73$

Πίνακας 3.1.2 Η επίδραση διαφορετικών αλατοτήτων στα βλεννοπαράγωγα κύτταρα των εντερικών λαχνών. Τα δεδομένα δίνονται με τη μορφή median \pm IQR. Διακρίνεται η στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων, με τις στήλες που έχουν τον ίδιο αστερίσκο να μην διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, $p < 0.05$

Αλατότητα	αριθμός goblet cell/ εντερική λάχνα
8	9 ^a \pm 3
14	5 ^b \pm 6
20	10 ^a \pm 5

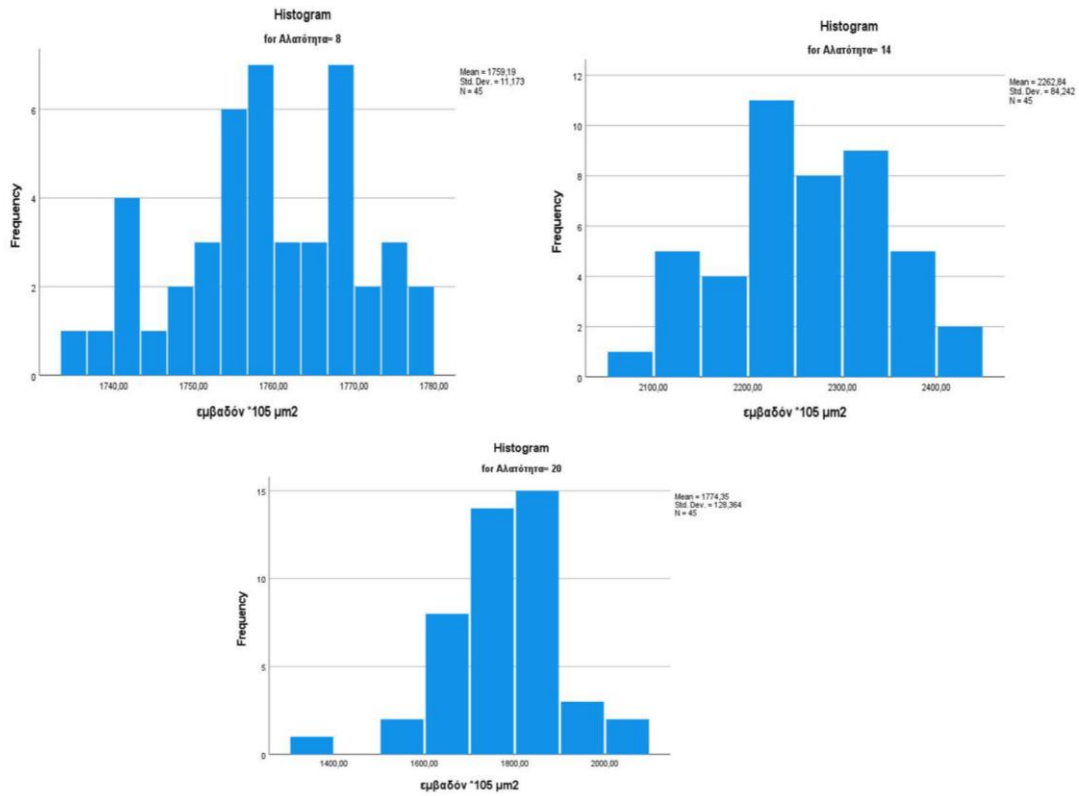
Πίνακας 3.1.3 Έλεγχος κανονικής κατανομής των δεδομένων για κάθε βαθμίδα αλατότητας, με το τεστ Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.05$.

Tests of Normality

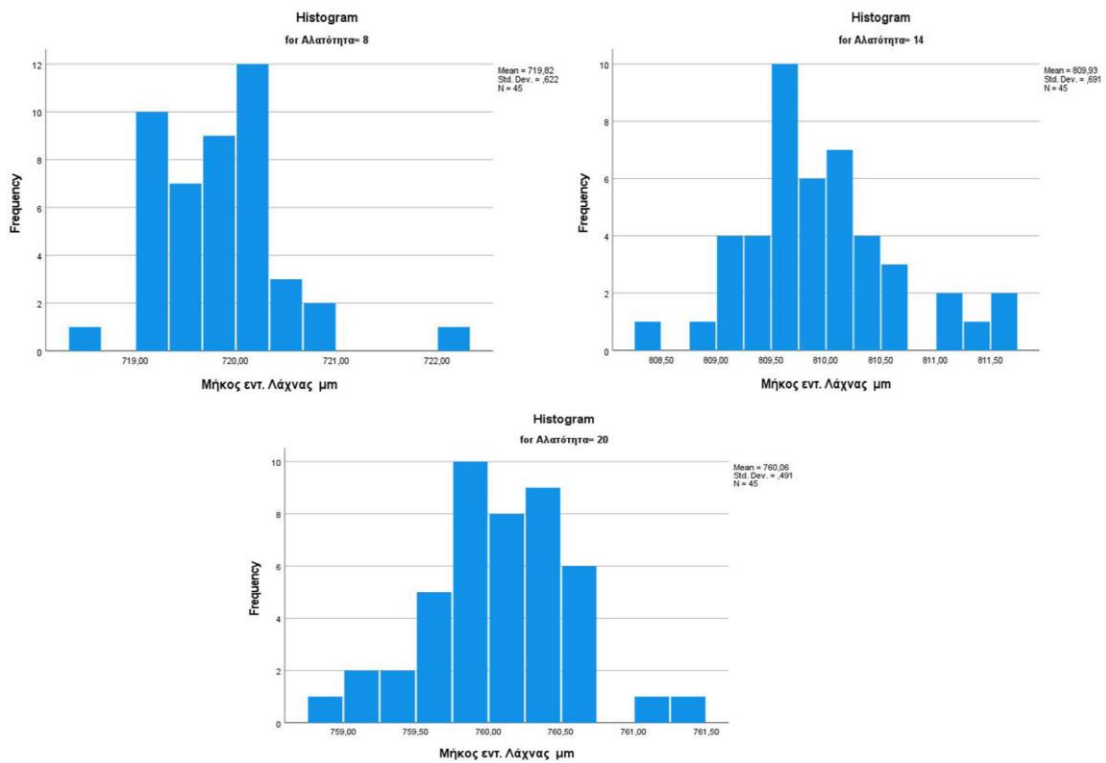
	Αλατότητα	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Sig.
εμβαδόν (105 μm^2)	8	,093	45	,200 [*]
	14	,090	45	,200 [*]
	20	,119	45	,117
Μήκος εντ. Λάχνας (μm)	8	,103	45	,200 [*]
	14	,120	45	,110
	20	,069	45	,200 [*]
goblet cell ανά εντερική λαχνα	8	,134	45	,042
	14	,142	45	,024
	20	,159	45	,006

*. This is a lower bound of the true significance.

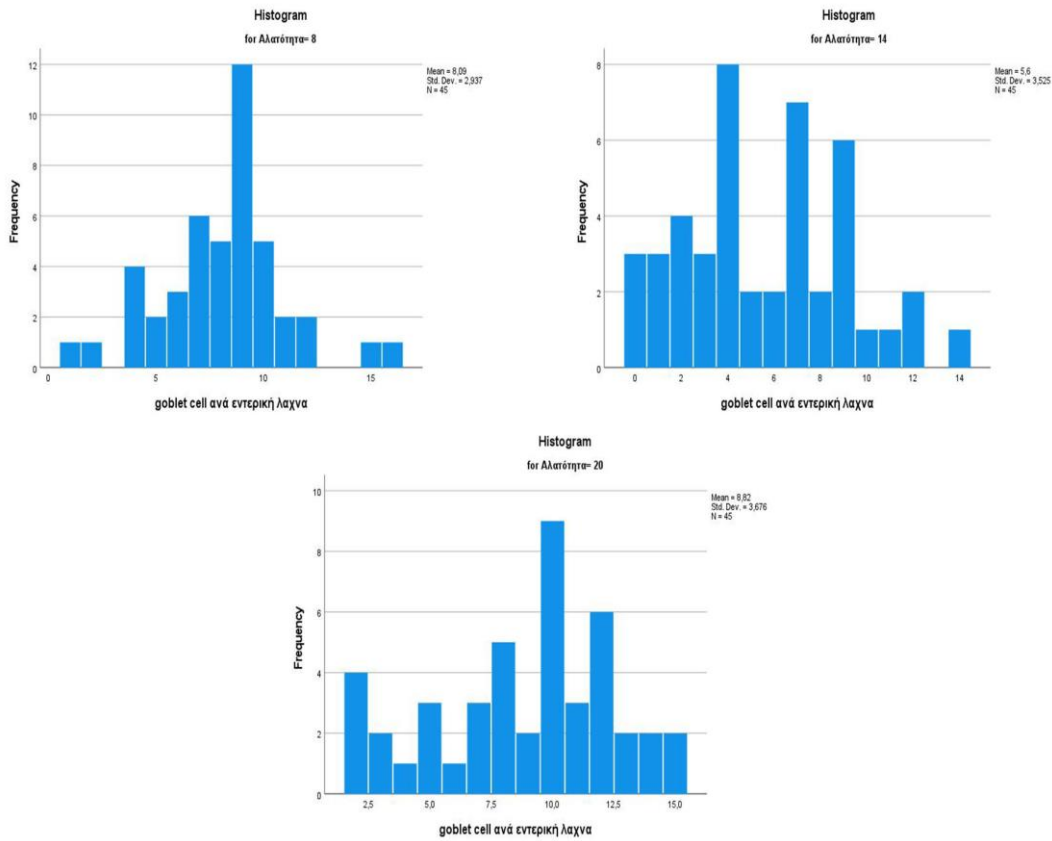
a. Lilliefors Significance Correction



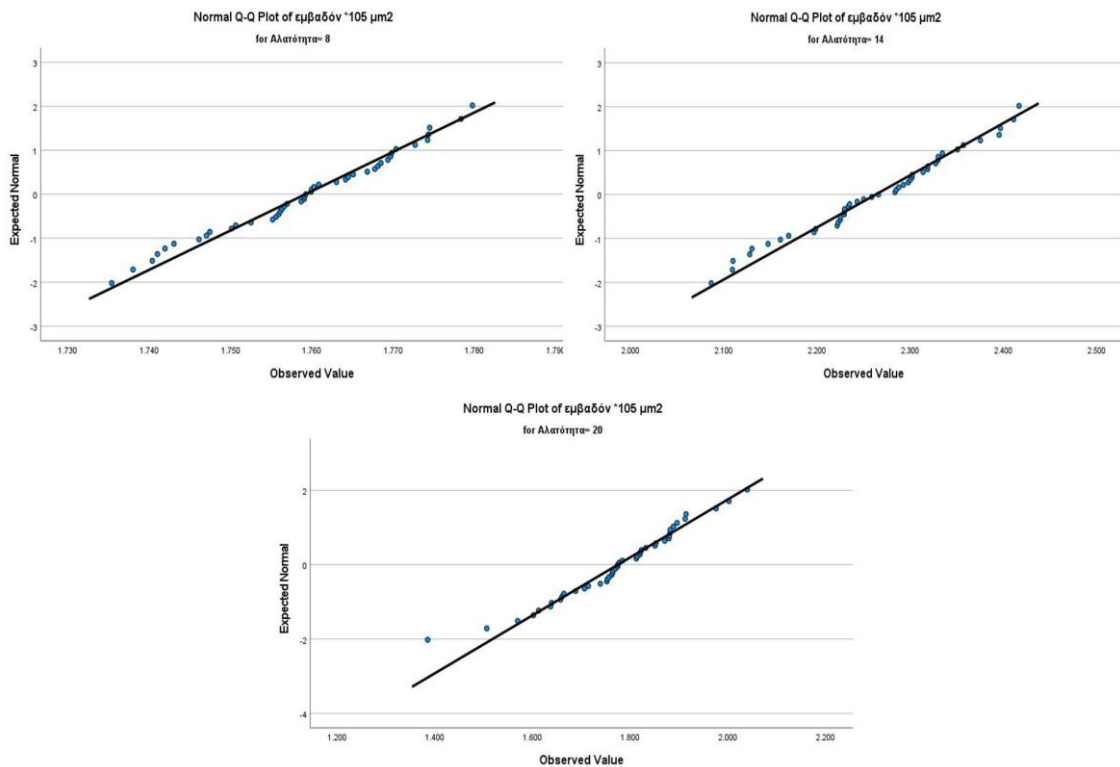
Εικόνα 3.1.1 Ιστογράμματα κατανομής των εμβαδών για Δ8, Δ14, Δ20, με την συχνότητα εμφάνισης των μετρήσεων. Διακρίνονται οι μέσοι ± τυπική απόκλιση.



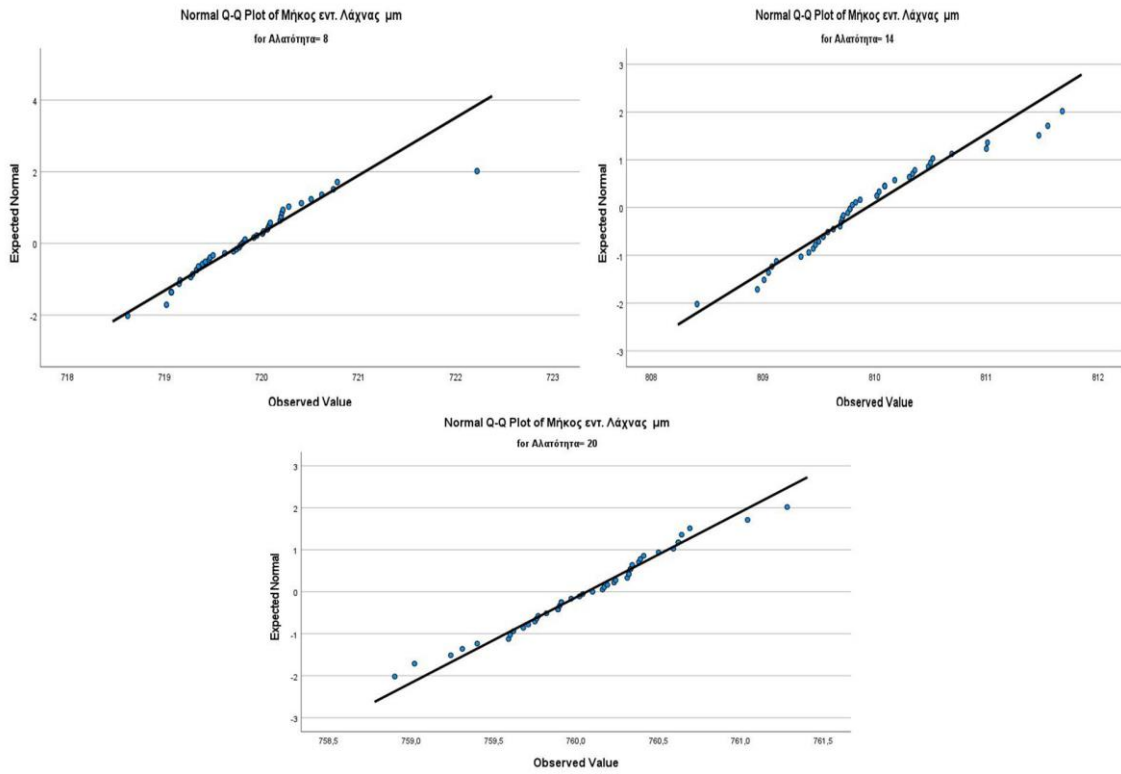
Εικόνα 3.1.2 Ιστογράμματα κατανομής του μήκους εντερικής λάχνας για Δ8, Δ14, Δ20 και η συχνότητα εμφάνισης των μετρήσεων. Διακρίνονται οι μέσοι ± τυπική απόκλιση.



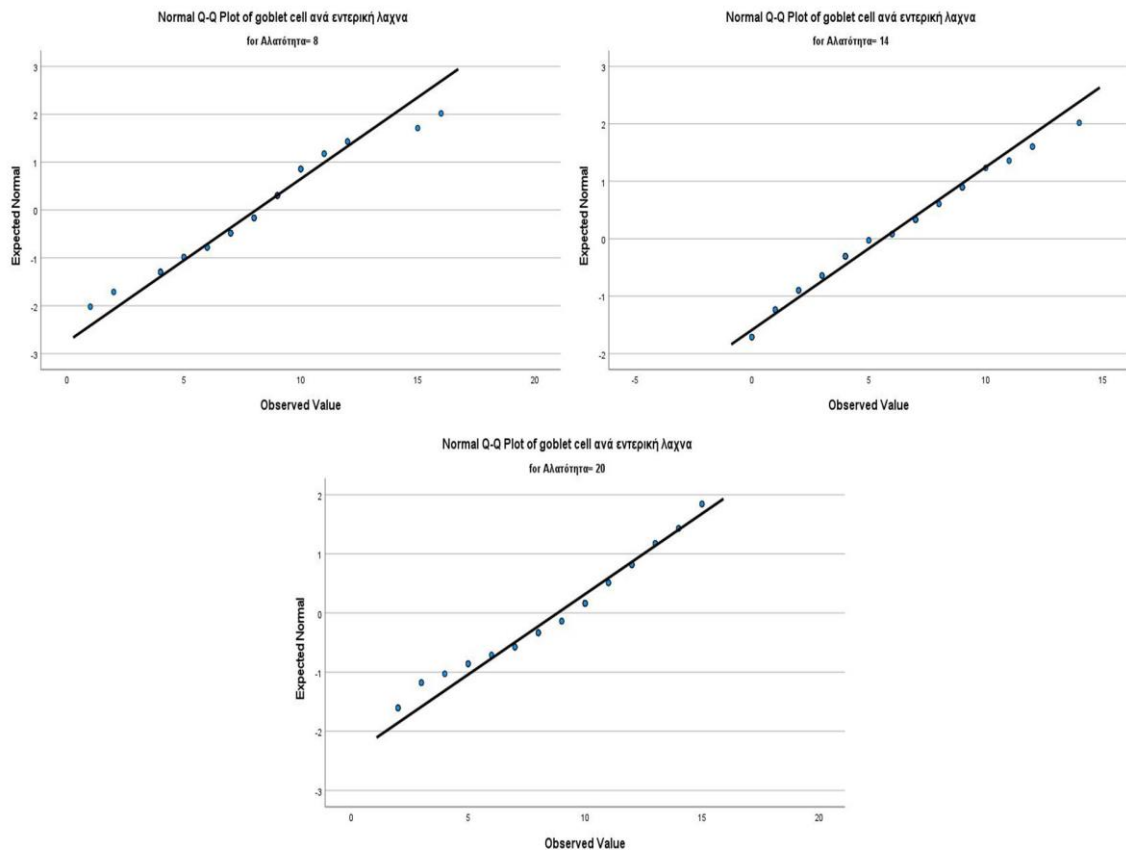
Εικόνα 3.1.3 Ιστογράμματα κατανομής των goblet cell ανά εντερική λάχνα για Δ8,Δ14,Δ20 και η συχνότητα εμφάνισης των μετρήσεων. Διακρίνονται οι μέσοι \pm τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.2.1 Q-Q plots για κανονική κατανομή ως προς το εμβαδόν για Δ8,Δ14,Δ20.



Εικόνα 3.2.2 Q-Q plots για κανονική κατανομή ως προς το μήκος της εντερ. λάχνας για $\Delta 8, \Delta 14, \Delta 20$.



Εικόνα 3.2.3 Q-Q plots για κανονική κατανομή ως προς τα goblet cell/εντερική λάχνα για Δ8,Δ14,Δ20.

Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο ομοιογένειας της διασποράς, που έγινε με βάση τους μέσους όρους για το εμβαδόν και το μήκος, αλλά με βάση τον μέσο για τα goblet cells, έδειξαν πως όλες οι ομάδες μετρήσεων του μήκους και των goblet cells/εντερ. λάχνα, δεν διαφέρουν σημαντικά, δηλαδή οι διακυμάνσεις πληθυσμού για κάθε βαθμίδα αλατότητας, είναι περίπου ίσες. Ωστόσο, για τις διακυμάνσεις των πληθυσμών ως προς το εμβαδόν διαπιστώθηκε ανομοιογένεια, για $p < 0.05$. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά post hoc tests.

Πίνακας 3.1.4 Έλεγχος ομοιογένειας της διασποράς με Levene 's Test, $p < 0.05$

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
εμβαδόν (105 μm^2)	Based on Mean	28,967	2	132	<,001
	Based on Median	28,896	2	132	<,001
	Based on Median and with adjusted df	28,896	2	70,708	<,001
	Based on trimmed mean	29,066	2	132	<,001
Μήκος εντ. Λάχνας (μm)	Based on Mean	1,380	2	132	,255
	Based on Median	1,008	2	132	,368
	Based on Median and with adjusted df	1,008	2	116,301	,368
	Based on trimmed mean	1,288	2	132	,279
goblet cell ανά εντερική λάχνα	Based on Mean	2,586	2	132	,079
	Based on Median	1,837	2	132	,163
	Based on Median and with adjusted df	1,837	2	126,886	,163
	Based on trimmed mean	2,538	2	132	,083

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των τριών ομάδων, για τις διαφορετικές αλατότητες, διαπιστώθηκε για το εμβαδόν και το μήκος, $p < 0.05$, πίνακας 3.1.5. Οι περαιτέρω πολλαπλές δοκιμές (post hoc tests) $p < 0.05$, έδειξαν, πως όσον αφορά τη σύγκριση των μέσων όρων \pm τυπική απόκλιση για το μήκος της εντερικής λάχνας, όλοι οι μέσοι διαφέρουν μεταξύ τους, πίνακας 3.1.6. Ως προς το εμβαδόν, ο μέσος όρος της $\Delta 14$, διαφέρει από την $\Delta 8$ και $\Delta 20$, πίνακας 3.1.7. Έπειτα, από την σύγκριση ανά δύο ομάδων αλατότητας για την παράμετρο των goblet cell/εντερ. λάχνα, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, με βάση τους median \pm IQR, όπου η $\Delta 14$ διέφερε από την $\Delta 8, \Delta 20$, αλλά η κατάταξη τιμών της $\Delta 8$ δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από την κατάταξη τιμών της ομάδας $\Delta 20$, $p < 0.05$, πίνακας 3.1.8.

Πίνακας 3.1.5 Σύγκριση μέσων όρων των τριών ομάδων δειγμάτων για αλατότητα 8,14,20 για κάθε εξαρτημένη μεταβλητή, με one-way Anova, $p < 0.05$.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
εμβαδόν (105 μm^2)	Between Groups	7387848,382	2	3693924,191	467,608	<,001
	Within Groups	1042750,500	132	7899,625		
	Total	8430598,882	134			
Μήκος εντ. Λάχνας (μm)	Between Groups	183397,901	2	91698,951	249150,814	<,001
	Within Groups	48,582	132	,368		
	Total	183446,483	134			

Πίνακας 3.1.6 Turkey's Post hoc test πολλαπλών δοκιμών με $p < 0.05$, για το μήκος εντερ. λάχνας.

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) Αλατότητα	(J) Αλατότητα	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Μήκος εντ. Λάχνας μm	8	14	-90,11200*	,12790	<,001	-90,4152	-89,8088
		20	-40,24622*	,12790	<,001	-40,5494	-39,9430
	14	8	90,11200*	,12790	<,001	89,8088	90,4152
		20	49,86578*	,12790	<,001	49,5626	50,1690
	20	8	40,24622*	,12790	<,001	39,9430	40,5494
		14	-49,86578*	,12790	<,001	-50,1690	-49,5626

Πίνακας 3.1.7 Dunnett T3 post hoc test πολλαπλών συγκρίσεων, $p < 0.05$ για το εμβαδόν εντερ. λάχνας.

Multiple Comparisons							
Dunnett T3							
Dependent Variable	(I) Αλατότητα	(J) Αλατότητα	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
εμβαδόν *105 μm^2	8	14	-503,65489*	12,66808	,000	-535,0095	-472,3002
		20	-15,16222	19,20770	,815	-62,7371	32,4127
	14	8	503,65489*	12,66808	,000	472,3002	535,0095
		20	488,49267*	22,88815	<,001	432,6567	544,3286
	20	8	15,16222	19,20770	,815	-32,4127	62,7371
		14	-488,49267*	22,88815	<,001	-544,3286	-432,6567

Πίνακας 3.1.8 Εφαρμογή Independent- Samples Mann-Whitney U Test για την σύγκριση των ομάδων αλατότητας ανά ζεύγη, με $p < 0.05$.

A) για την ομάδα αλατότητας 8 με 14.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig. ^{a,b}	Decision
1	The medians of goblet cell ανά εντερική λαχνα are the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Median Test	,003 ^c	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of goblet cell ανά εντερική λαχνα is the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	<,001	Reject the null hypothesis.

a. The significance level is ,050.

b. Asymptotic significance is displayed.

c. Yates's Continuity Corrected Asymptotic Sig.

B) για την ομάδα αλατότητας 8 με 20.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig. ^{a,b}	Decision
1	The medians of goblet cell ανά εντερική λαχνα are the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Median Test	,009 ^c	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of goblet cell ανά εντερική λαχνα is the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,129	Retain the null hypothesis.

a. The significance level is ,050.

b. Asymptotic significance is displayed.

c. Yates's Continuity Corrected Asymptotic Sig.

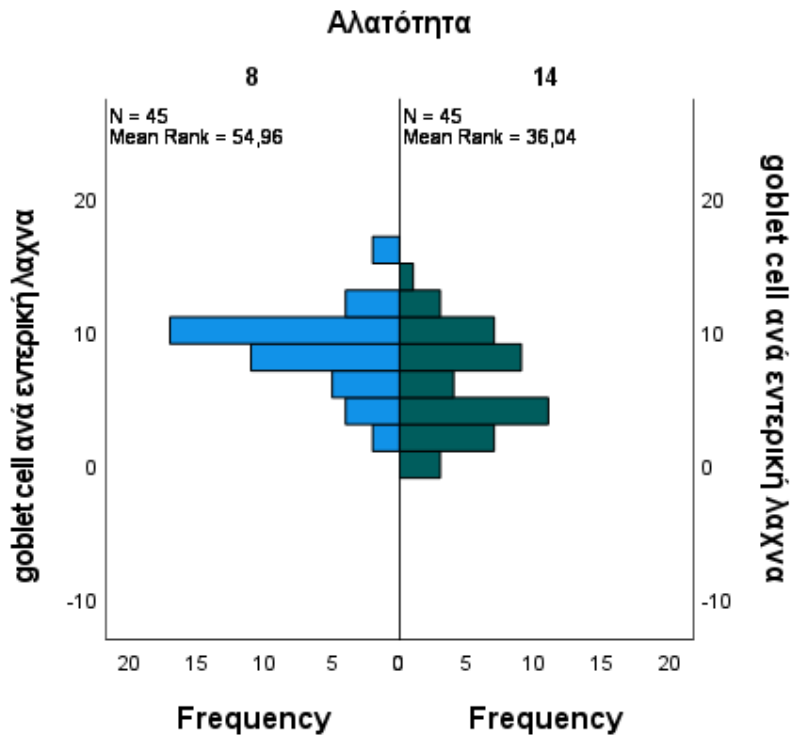
Γ) για την ομάδα αλατότητας 14 με 20.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig. ^{a,b}	Decision
1	The medians of goblet cell ανά εντερική λαχνα are the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Median Test	<,001 ^c	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of goblet cell ανά εντερική λαχνα is the same across categories of Αλατότητα.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	<,001	Reject the null hypothesis.

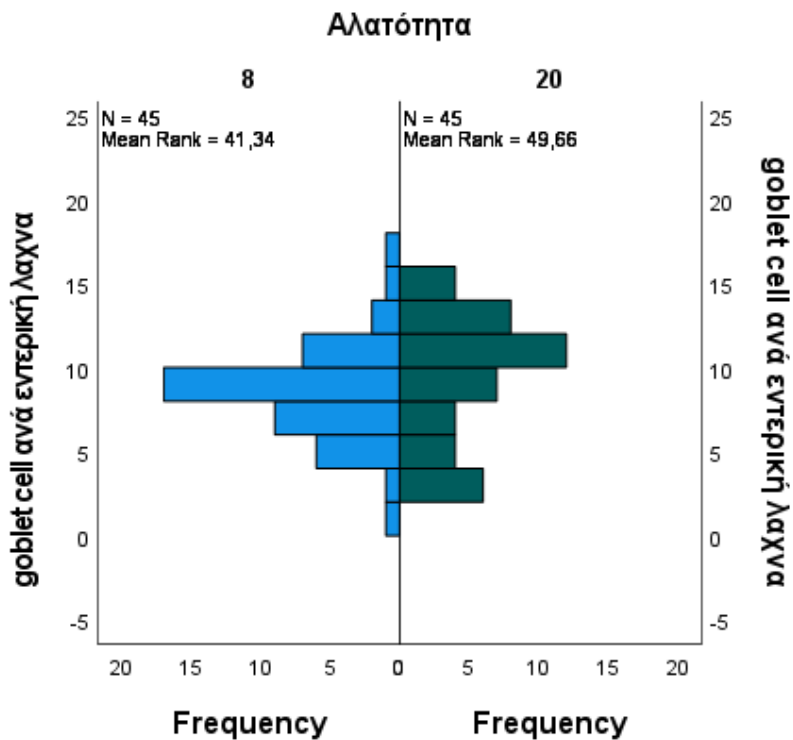
a. The significance level is ,050.

b. Asymptotic significance is displayed.

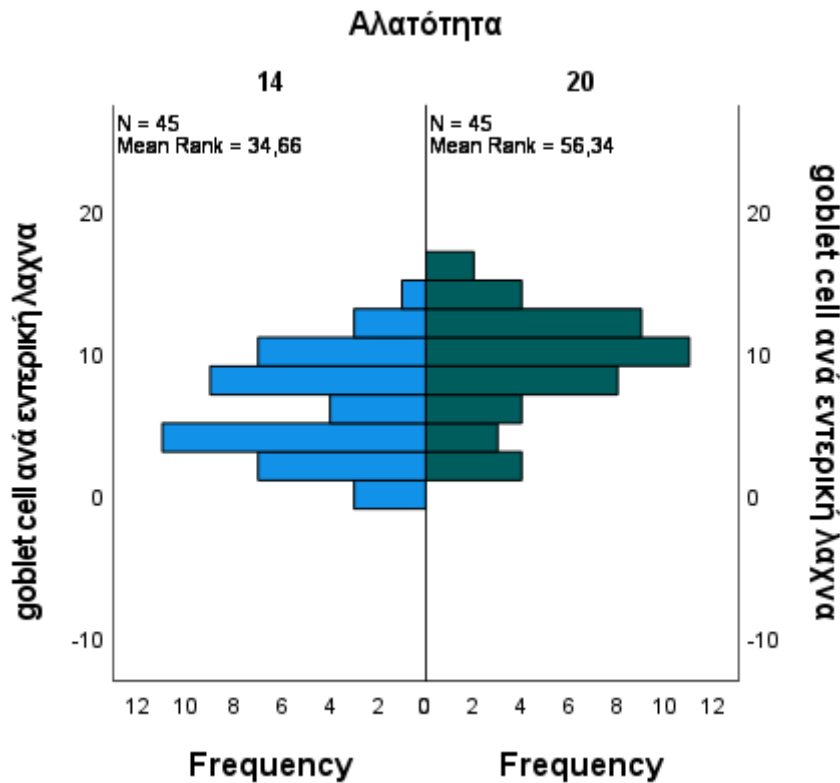
c. Yates's Continuity Corrected Asymptotic Sig.



Εικόνα 3.2.4 Η σύγκριση των δύο ομάδων Δ8 και Δ14, μέσω της κατάταξης τιμών(mean rank), με Mann -Whitney U test, $p < 0.05$.



Εικόνα 3.2.5 Η σύγκριση των δύο ομάδων Δ8 και Δ20, μέσω της κατάταξης τιμών(mean rank), με Mann -Whitney U test, $p < 0.05$.

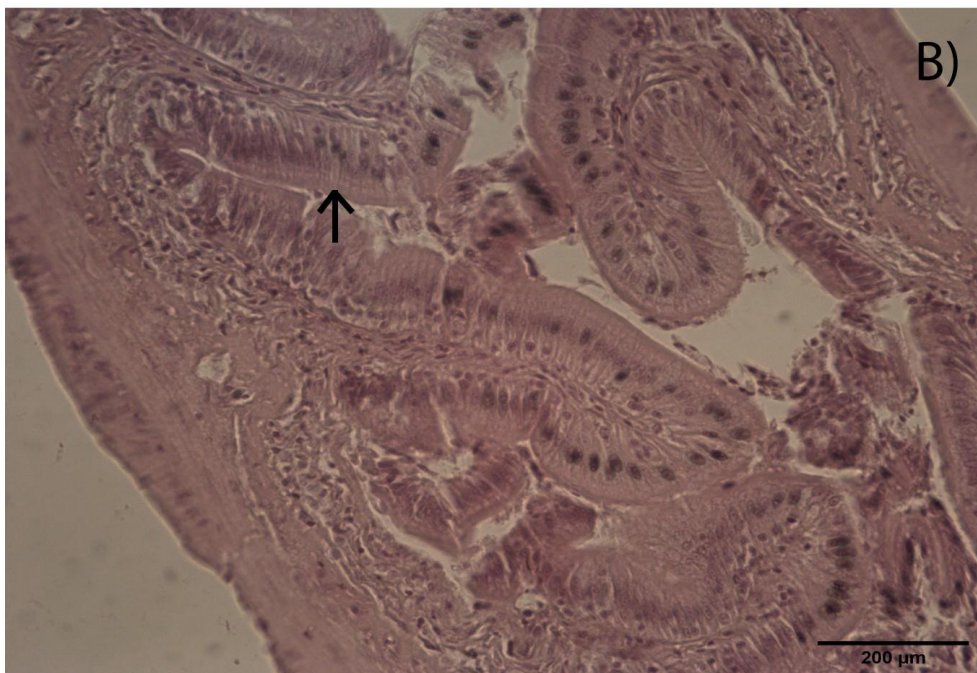
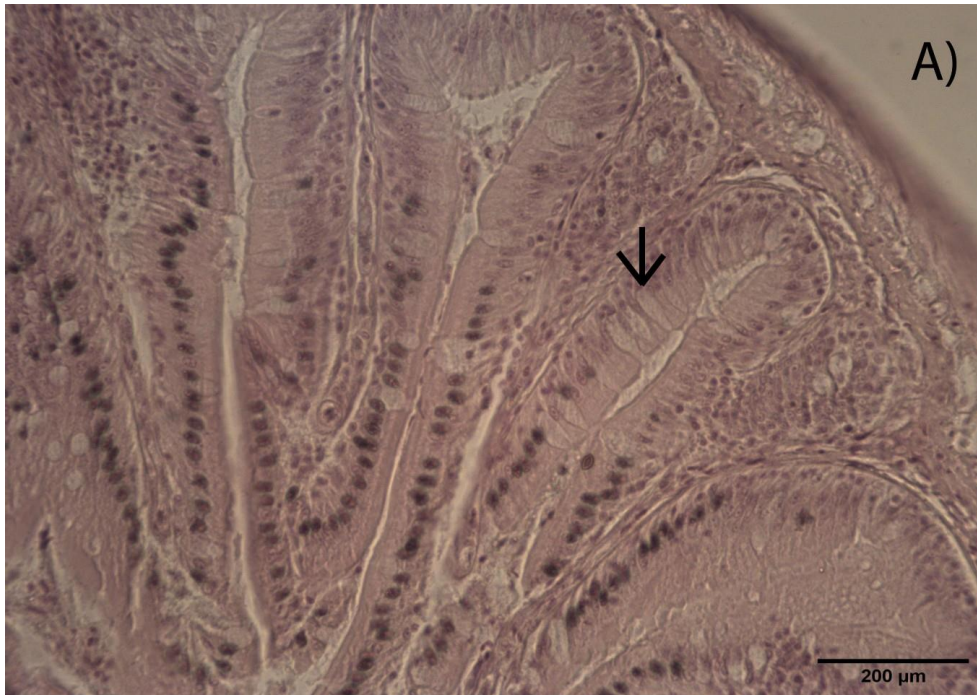


Εικόνα 3.2.6 Η σύγκριση των δύο ομάδων Δ14 και Δ20, μέσω της κατάταξης τιμών(mean rank), με Mann -Whitney U test, $p < 0.05$.

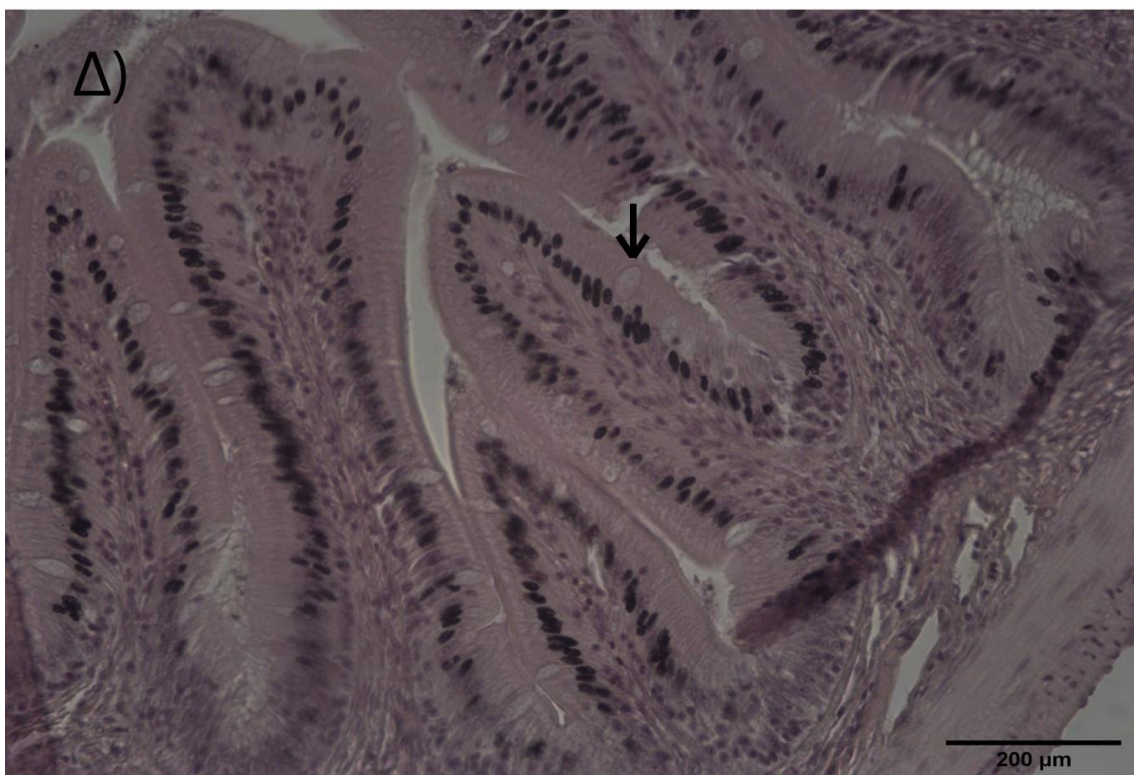
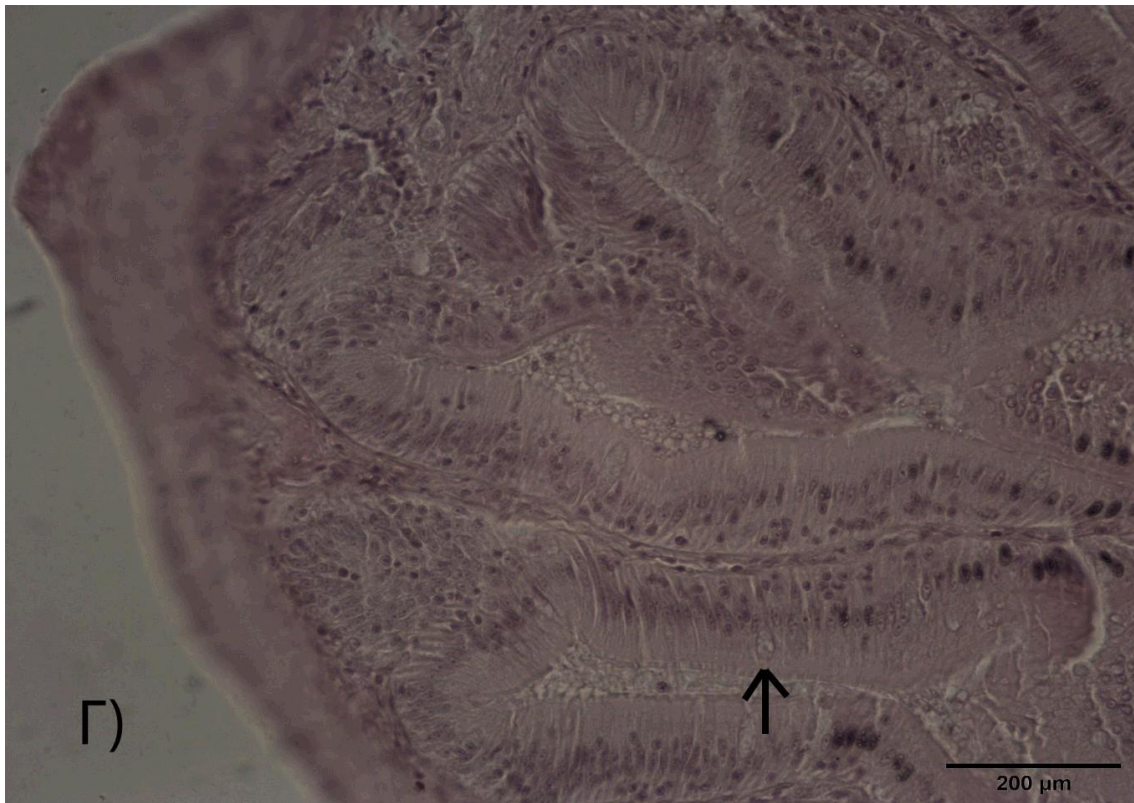
3.2 Ιστολογικά Αποτελέσματα

Σε όλα τα δείγματα που παρατηρήθηκαν, δεν υπήρχε ένδειξη κάποιας σοβαρής μορφολογικής αλλοίωσης, με βάση τη γενική φυσιολογική μορφολογία του εντέρου των θαλάσσιων οστειχθύων (grade 0). Τα ιστολογικά δείγματα που προήλθαν από τις τρεις διαφορετικές αλατότητες (Δ8, Δ14, Δ20) δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους. Όλα εμπεριείχαν την απαραίτητη δομική οργάνωση, αποτελούμενη από το χόριο βλεννογόνου, τον υποβλεννογόνου χιτώνα, της εξωτερικής και εσωτερικής μυϊκής στιβάδας, τον εξωτερικό ορογόνο χιτώνα και τον αυλό. Στο επιθήλιο του εντέρου ήταν ευδιάκριτα σε όλες τις ομάδες τα εντεροκύτταρα με ψυκτροειδή παρυφή, τα goblet cells ως βλεννογόνα κύτταρα, αιμοφόρα αγγεία και μερικά διάσπαρτα (μικρός αριθμός) λιποσταγονίδια στο κυτταρόπλασμα των εντεροκυττάρων. Τα εντεροκύτταρα ήταν στενά, επιμήκη και βάρφτηκαν με σκούρα απόχρωση, ανάμεσα στα οποία ήταν διάσπαρτα τα καλυκοειδή κύτταρα goblet cells, κάποια εκ των οποίων

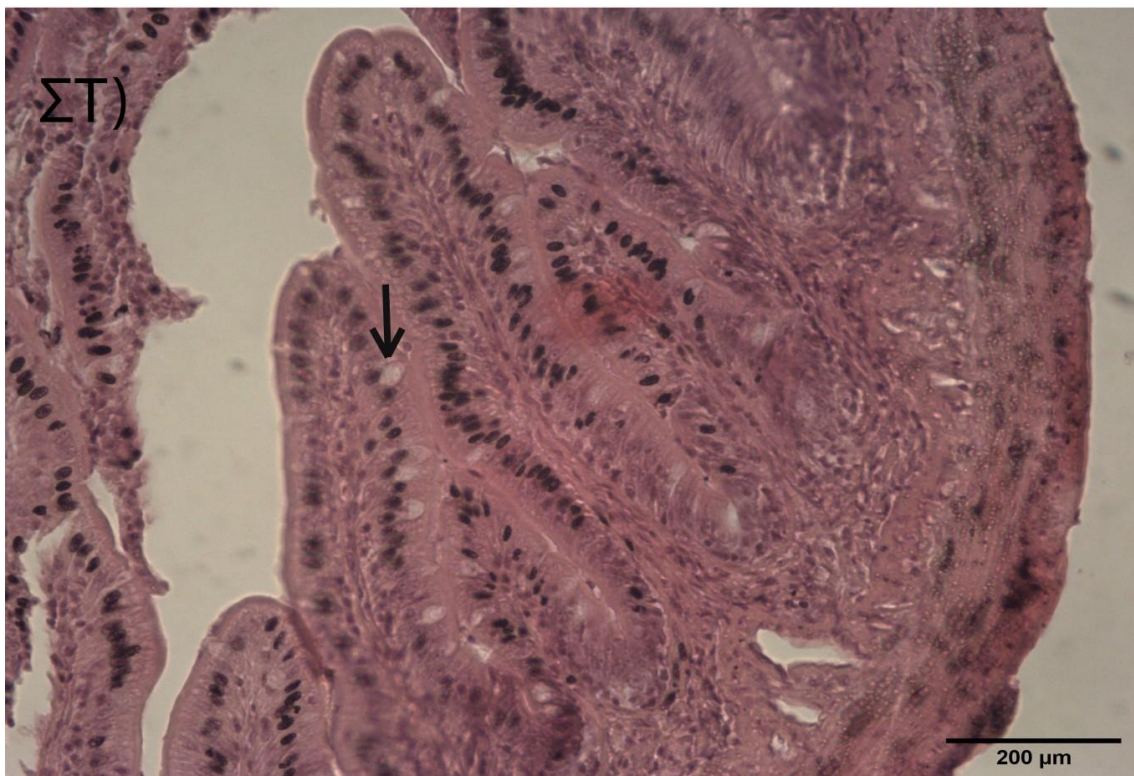
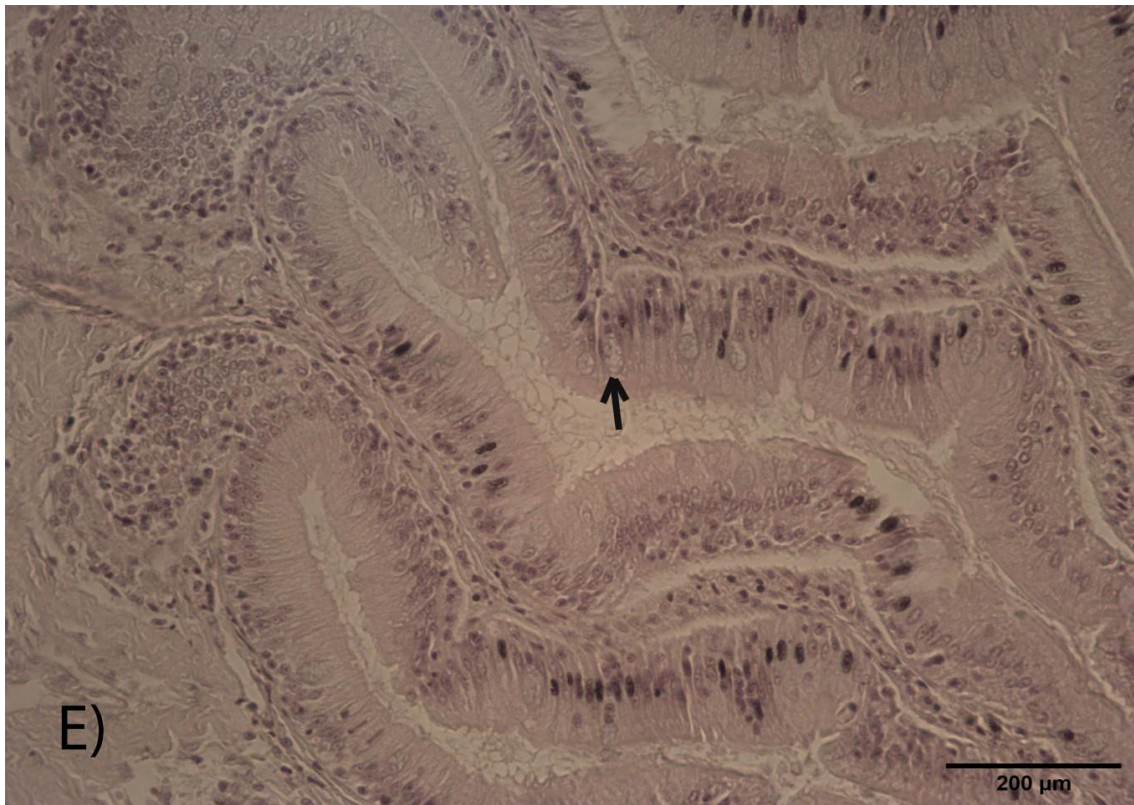
συναντήθηκαν σε φάση έκκρισης βλέννας. Ωστόσο, στο οπτικό μικροσκόπιο ήταν εμφανής η διαφορά του εμβαδού και του μήκους μεταξύ των εντερικών λαχνών στις διαφορετικές ομάδες αλατότητας (Εικόνα 3.2.1 – 3.2.3), με τα δείγματα που προέρχονταν από την ομάδα αλατότητας 14 να είναι μεγαλύτερα, έναντι των 8 και 20. Ο αριθμός των καταμετρημένων goblet cell/ εντερική λάχνα, όπως φάνηκε και από τη στατιστική ανάλυση ήταν υψηλότερος στις ομάδες της Δ8 και Δ20, σε αντίθεση με της Δ14.



Εικόνα 3.2.1 Ιστολογικά δείγματα εντέρου του *D. labrax* στα 8ηρη, όπου διακρίνονται οι εντερικές λάχνες με εντεροκύτταρα και βλεννογόνα καλυκκοειδή κύτταρα (βέλη), scale bar= 200μm. (Προσωπικό αρχείο, Μαμάη Πολυξένη).

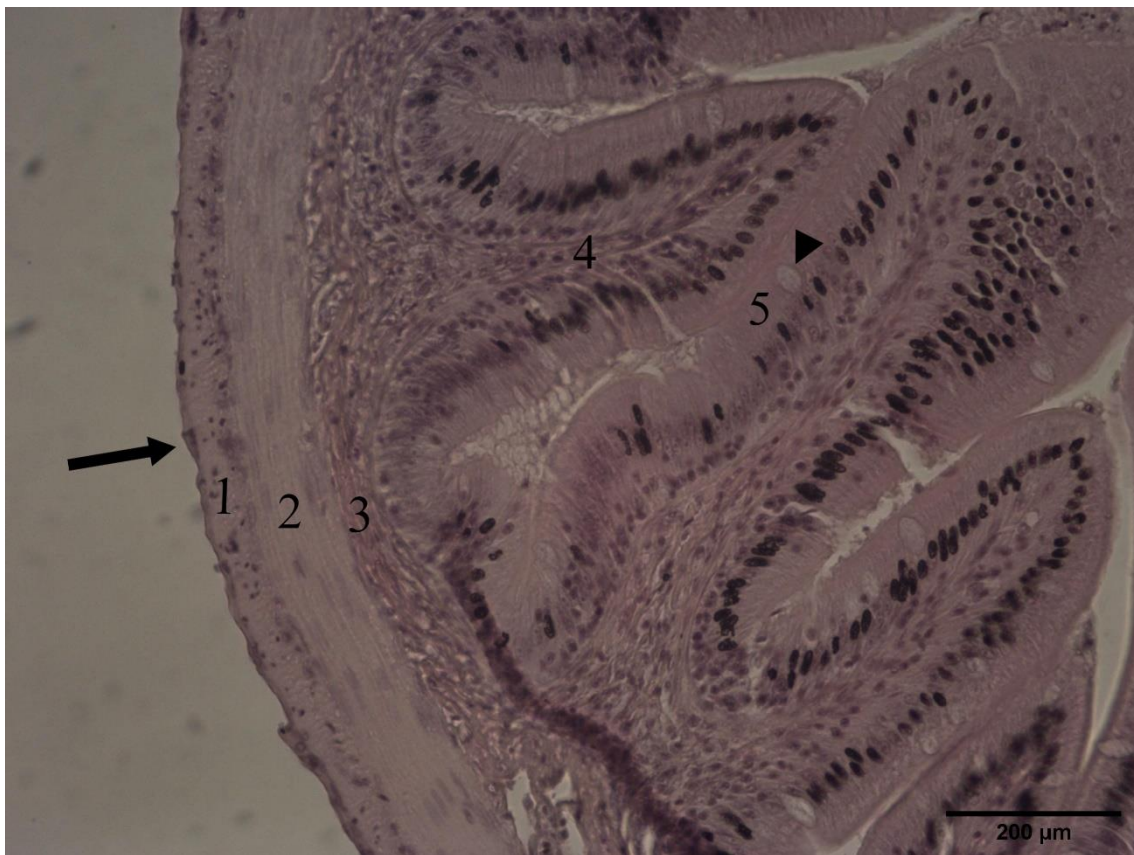


Εικόνα 3.2.2 Ιστολογικά δείγματα εντέρου του *D. labrax* στα 14rpt, όπου διακρίνονται οι εντερικές λάχνες με εντεροκύτταρα και βλεννογόνα καλυκκοειδή κύτταρα – goblet cells (βέλη). Scale bar= 200 μm (Προσωπικό αρχείο).



Εικόνα 3.2.3 Ιστολογικά δείγματα εντέρου του *D. labrax* στα 20 \times , όπου διακρίνονται οι εντερικές λάχνες με εντεροκύτταρα και βλεννογόνα καλυκοειδή κύτταρα – goblet cells (βέλη). Scale bar= 200 μ m (Προσωπικό αρχείο)

Στην Εικόνα 3.2.4 διακρίνεται η λεπτομερής ιστολογική τομή του πρόσθιου τμήματος εντέρου του λαβρακίου από δείγμα της ομάδας αλατότητας 14, στην οποία επιβεβαιώνεται η φυσιολογική ιστολογική δομή με την βοήθεια της χρώσης Ηωσίνης – Αιμοτοξυλίνης. Επιπλέον, είναι ευδιάκριτα σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ηωσινόφιλα κοκκώδη κύτταρα στον υποβλεννογόνο χιτώνα.



Εικόνα 3.2.4 Ιστολογική τομή πρόσθιου εντέρου ενήλικου ατόμου *D. labrax* από την δεξαμενή των 14ppt. Απεικονίζονται: Ο ορογόνος χιτώνας (βέλος), 1)έξω επιμήκης μυϊκή στιβάδα, 2) έσω κυκλοτερή μυϊκή στιβάδα, 3) υποβλεννογόνος χιτώνας, 4) χόριο βλεννογόνου, 5) επιθήλιο βλεννογόνου με καλυκοειδή κύτταρα (αιχμή βέλους). Scale bar= 200 μm (Προσωπικό αρχείο. Μαμάη Πολυξένη, 2021).

4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Σε αυτήν την έρευνα, ελέγχθηκε η πιθανότητα, η ιστολογική δομή του εντέρου του λαβρακίου να εμφανίζει ανωμαλίες ή να επηρεάζεται από διαφορετικές αλατότητες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπάρχει βλάβη ή δυσμορφία στην μορφολογία, δομή και οργάνωση του εντέρου, για καμία από τις διαφορετικές ομάδες αλατότητας. Σύμφωνα με άλλα πειράματα, σε άτομα λαβρακίου και παρόμοια είδη, αποδείχθηκε ότι διαφορετικές αλατότητες από 38ppt έως και <1ppt, δεν επίδρασαν αρνητικά την ανάπτυξη, την λειτουργία και την ιστολογική δομή του εντέρου (Stathopoulou P., et al, 2021) (Vlahos N., et al, 2019) (Yilmaz H., et al, 2020). Κατ' επέκταση, αυτό σημαίνει πως μάλλον, δεν επηρεάστηκε ούτε η ωσμωρύθμιση των τριών ομάδων, καθώς όπως αποδείχθηκε το επιθήλιο του εντέρου δεν υπέστη κάποια αλλοίωση (grade 0). Ωστόσο, για περισσότερη ακρίβεια ως προς το εάν οι διαφορετικές αλατότητες επηρεάζουν την ωσμωρύθμιση θα χρειαζόταν ένα πείραμα μέτρησης των ιόντων ΝΚΑ και της κατανάλωσης ενέργειας που χρειάστηκε για την διατήρηση της, ώστε να αποδειχθεί, αν και πόσο αυτές οι μεταβολές είναι σημαντικές. Σε άλλη έρευνα που μελετήθηκε η επίδραση του στρες (από διαφορετικές θερμοκρασίες και αλατότητες) στην ωσμωρύθμιση νεαρών ατόμων λαβρακίου, όπου μεταφέρθηκαν από θαλασσινό νερό σε γλυκό νερό, έδειξε πως σε συνδυασμό με την μεταβολή της θερμοκρασίας, τα άτομα εμφάνισαν διαφορά στην επίδοση της ωσμωρύθμισης στα βράγχια, γεγονός που επενέργησε την συνολική ισορροπία ΝΚΑ των οργανισμών (Masroor W., et al, 2018). Σε διαφορετικές αλατότητες, όμως με σταθερή τη θερμοκρασία, δεν φαίνεται κάποια αλλοίωση του επιθήλιου του εντέρου, για να τεθεί το ερώτημα ανισορροπίας των ιόντων ΝΚΑ, τουλάχιστον σε επίπεδο εντέρου.

Οι διαφορές που φάνηκαν στις ομάδες ως προς το εμβαδόν, το μήκος της εντερικής λάχνας και την ποσότητα των goblet cell/εντερ. λάχνα μπορεί να ευθύνονται σε διαφορετικούς παράγοντες. Από τα δεδομένα παρατηρήθηκε ότι, στα άτομα της Δ14, οι εντερικές λάχνες ήταν πιο ανεπτυγμένες από τις άλλες ομάδες, αλλά δεν αποδεικνύει απαραίτητα, πως είχαν καλύτερη επίδοση ως προς την λειτουργία τους, σε σχέση με αυτά της Δ8 και Δ20. Ακόμη, ο αριθμός των goblet cell στην Δ14 ήταν κατά μέσο μικρότερος, από της Δ8 και Δ20. Όμως, είναι αποδεδειγμένο πως ο αριθμός των goblet cell είναι

αυξανόμενος σε κατάσταση υποσιτισμού ή έλλειψης τροφής , όπως είναι αποδεδειγμένη και η αναγκαιότητα τους για την απορρόφηση των θρεπτικών και της γενικότερης φυσιολογικής υγείας του εντέρου (Berillis P. & Mente E., 2017). Οπότε, πιθανώς η συγκεκριμένη διαφορά του αριθμού των εντερικών goblet cell, να οφείλεται στην διατροφική κατάσταση και όχι , στο φαινόμενο της διαφορετικής βαθμίδας αλατότητας. Δεν μπορεί να διευκρινιστεί από την συγκεκριμένη έρευνα, αν οι πιο ανεπτυγμένες λάχνες σε συνδυασμό με την μικρότερη παρουσία goblet cell στα άτομα της Δ14, είναι απόρροια της επίδρασης την αλατότητας ή δύο τυχαία γεγονότα.

Πείραμα που έγινε σε ομάδες του *D. labrax*, όπου δοκιμάστηκαν διαφορετικές συχνότητες σίτισης σε συνδυασμό με την υδροπονική παραγωγή μαρουλιού, με σταδιακή μείωση της αλατότητας έως <1ppt, που αναφέρθηκε παραπάνω , δεν έδειξε ιστολογική αλλοίωση του εντέρου του λαβρακίου, με καμία υπόδειξη ιστοπαθολογικής κατάστασης (Stathopoulou P., et al, 2021). Ωστόσο, αποδείχθηκε πως η συχνότερη σίτιση μέσα στην ημέρα προσφέρει καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής, άρα η αποδοτικότητα του εντέρου επηρεάστηκε περισσότερο από την συχνότητα της σίτισης και όχι από την διαφορετική αλατότητα. Έρευνα των Vlahos et al (2019) δεν εντόπισε βλάβες στην ιστολογική δομή και λειτουργία του εντέρου του είδους *Sparus aurata* (τσιπούρας) σε αλατότητες των 8 και 20ppt, σε υδροπονικό πείραμα υφάλμυρων νερών σε συνδυασμό με την ανάπτυξη *Crithmum maritimum* (κρίταμου).

Είναι αποδεδειγμένο, επίσης, πως η γενικότερη ανάπτυξη του λαβρακίου σε γλυκό νερό με χαμηλότερες αλατότητες των 10 και 20 ppt, σε σχέση με 30 – 40 ppt, είναι καλύτερη (Eroldogan & Kumlu, 2002). Δεν είναι σαφές, στην επιστημονική κοινότητα των ιχθυολόγων σχετικά με το αν η αλατότητα επηρεάζει πραγματικά, τα ευρύαλα είδη και συγκεκριμένα, υπάρχει διαφωνία με το αν η προσαρμογή σε γλυκό νερό προκαλεί συνολική βλάβη στην ανάπτυξη του οργανισμού, απώλεια όρεξης και αύξηση της θνησιμότητας (Allegrucci et al., 1995; Eroldogan et. al., 2004) ή προσφέρει τις ίδιες ή καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης από το θαλασσινό νερό (Nozzi et al., 2016; Islam et al., 2020; Yilmaz et al., 2020).

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη συμβάλλει συμπληρωματικά σε άλλες παρόμοιες έρευνες, αποδεικνύοντας πως ευρύαλα είδη όπως το λαβράκι έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν φυσιολογικά σε χαμηλές αλατότητες, χωρίς ιστολογικά το έντερο να

υποστεί βλάβες ή να επηρεαστεί η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών με αυτή τη μεταβολή σε ένα διάστημα εκτροφής 60 ημερών σε εργαστηριακές συνθήκες. Με αυτήν την έρευνα, γίνεται συνεισφορά στη βιβλιογραφία του είδους, καθώς αποτελεί σπουδαία οικονομική δύναμη στις ιχθυοκαλλιέργειες , ενώ ταυτόχρονα συνεισφέρει σε νέες αναπτυσσόμενες ιδέες υδροπονικών συστημάτων, όπου χαμηλότερες αλατότητες απαιτούνται για την καλλιέργεια φυτών, λαχανικών κ.α. Τα υδροπονικά συστήματα θα έχουν μεγάλη απήχηση τα επερχόμενα χρόνια στον κλάδο της Γεωπονίας, για αυτό θα χρειαστούν παρόμοιες, περαιτέρω έρευνες για την καλύτερη ανάπτυξη τους.

5. Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Παναγιώτης Βερίλλης, & Έλενα Μεντέ. (2017). *Ιστοφυσιολογία Ιχθύων και Καρκινοειδών* (Δημήτρης Τσιάπας, Ed.; 1η, Vol. 12). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 192-197.
- Χρίστος Ν. Νεοφύτου. (2015). *Βιολογία ιχθύων & θαλάσσιων θηλαστικών: Vol. 2.2* (1η). University Studio Press, 225-226.
- Χρίστος Ν. Νεοφύτου, & Νικόλαος Χ. Νεοφύτου. (2015). *Ιχθυολογία* (2η, Vol. 1). University Studio Press, 53-56.

Ξένη Βιβλιογραφία

- Alliot, E., Pastoureaud, A., & Thebault, H. (1983). Influence de la temperature et de la salinite sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 31(2-4), 181-194. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90312-5)
- Berillis, P., & Mente, E. (2017). Histology of Goblet Cells in the Intestine of the Rainbow Trout Can Lead to Improvement of the Feeding Management. *Journal of FisheriesSciences*, 11(4), 32-033. www.fisheriessciences.com
- Bjørngen, H., Li, Y., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., & Koppang, E. O. (2020). Anatomy, immunology, digestive physiology and microbiota of the salmonid intestine: Knowns and unknowns under the impact of an expanding industrialized production. *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 172-186. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.09.032>
- Bodinier, C., Sucré, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., & Charmantier, G. (2010). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream

- Sparus aurata. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 157(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2010.06.185>
- Boutet, I., Long Ky, C. L., & Bonhomme, F. (2006). A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene*, 379(1–2), 40–50. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2006.04.011>
- Chervinski J., & Lahav M. (1979). Freshwater feed of young European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 31, 44–48.
- David, W., & Groman, B. (1982). *HISTOLOGY OF THE STRIPED BASS* (1st ed.). American Fisheries Society.
- de Silva, S. S., & Perera, P. A. B. (1976). Studies on the young grey mullet, *Mugil cephalus* L.: I. Effects of salinity on food intake, growth and food conversion. *Aquaculture*, 7(4), 327–338. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(76\)90129-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(76)90129-0)
- Dendrinis, P., & Thorpe, J. P. (1985). Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture*, 49(3–4), 333–358. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90090-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90090-0)
- Elliott, D. G. (2011). THE SKIN | Functional Morphology of the Integumentary System in Fishes. *Encyclopedia of Fish Physiology*, 476–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00108-8>
- Eroldoğan, O. T., Kumlu, M., & Aktaş, M. (2004). Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture*, 231(1–4), 501–515. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2003.10.020>
- Eroldogan, Tufan and Kumlu, & Metin. (2022). Growth performance, body traits and fillet composition of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in various salinities and fresh water. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26, 993–1001.
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., & Castille, R. (2007). The role of the gut in salinity adaptation of the sea-bass *Dicentrarchus labrax* during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), S94. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.141>
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., & Castille, R. (2006). Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation. *Development Growth and Differentiation*, 48(3), 139–151. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00852.x>

- Giffard-Mena, I., Lorin-Nebel, C., Charmantier, G., Castille, R., & Boulo, V. (2008). Adaptation of the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) to fresh water: Role of aquaporins and Na⁺/K⁺-ATPases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *150*(3), 332–338. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2008.04.004>
- Hegemann, A., Finlay, R. W., Poole, R., Rogan, G., Dillane, E., Cotter, D., & Reed, T. E. (2021). *Hyper- and Hypo-Osmoregulatory Performance of Atlantic Salmon (Salmo salar) Smolts Infected With Pomphorhynchus tereticollis (Acanthocephala)*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.689233>
- Hickman P. Cleveland, Larry S. Robert, Susan L. Keen, David J. Eisenhour, Allan Larson, & Helen I' Anson. (2014). *Integrated principles of Zoology 2* (16th ed., Vol. 30). Mc Graw Hill Education.
- John Halver, & Ronald Hardy. (2002). *Fish Nutrition* (3d ed., Vol. 7). ELSEVIER INC., Delaware.
- Linnaeus 1758. (n.d.). *Fish base, Dicentrarchus labrax (Linnaeus 1758) European sea bass*.
- Masroor, W., Farcy, E., Gros, R., & Lorin-Nebel, C. (2018). Effect of combined stress (salinity and temperature) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* osmoregulatory processes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *215*, 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.10.019>
- Olsson, C. (2010). The enteric nervous system. *Fish Physiology*, *30*(C), 319–349. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03008-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03008-6)
- Santos, M. L. dos, Arantes, F. P., Santiago, K. B., & Santos, J. E. dos. (2015). Morphological characteristics of the digestive tract of *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875), (Characiformes: Anostomidae): An anatomical, histological and histochemical study. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *87*(2), 867–878. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140230>
- Stathopoulou, P., Berillis, P., Vlahos, N., Nikouli, E., Kormas, K. A., Levizou, E., Katsoulas, N., & Mente, E. (2021). Freshwater-adapted sea bass *Dicentrarchus labrax* feeding frequency impact in a lettuce *Lactuca sativa* aquaponics system. *PeerJ*, *9*. <https://doi.org/10.7717/peerj.11522>
- Torrecillas, S., Terova, G., Makol, A., Serradell, A., Valdenegro, V., Gini, E., Izquierdo, M., Acosta, F., & Montero, D. (2019). Dietary phytochemicals and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gut health and implications on in vivo gut bacterial translocation. *PLoS ONE*, *14*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222063>
- Vlahos, N., Levizou, E., Stathopoulou, P., Berillis, P., Antonopoulou, E., Bekiari, V., Krigas, N., Kormas, K., & Mente, E. (2019). An experimental brackish aquaponic system using juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and rock samphire (*Crithmum maritimum*). *Sustainability (Switzerland)*, *11*(18). <https://doi.org/10.3390/su11184820>
- Yilmaz, H. A., Turkmen, S., Kumlu, M., Eroldogan, O. T., & Perker, N. (2020a). Alteration of growth and temperature tolerance of european sea bass (*Dicentrarchus labrax* linnaeus 1758) in different temperature and salinity combinations. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *20*(5), 331–340. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_01
- Yilmaz, H. A., Turkmen, S., Kumlu, M., Eroldogan, O. T., & Perker, N. (2020b). Alteration of Growth and Temperature tolerance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Different Temperature and Salinity Combinations. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *20*(5). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_01