

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ &
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Χρήση αναισθητικών ουσιών στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια»

ΧΑΣΑΝ ΕΡΝΤΙ

ΒΟΛΟΣ 2010

«Χρήση αναισθητικών ουσιών στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα,**

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος,**

3) Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, την κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και κ. Ελένη Γκολομάζου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Εμμανουήλ Μαλανδράκη, υποψήφιο διδάκτορα, για τη καθοριστική συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της διατριβής. Η βοήθειά του ήταν πολύτιμη και χωρίς αυτή, δεν θα είχε πραγματοποιηθεί η παρούσα προπτυχιακή διατριβή. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Πίκουλα, για την φιλική του συμπαράσταση και την άριστη συνεργασία που είχα μαζί του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής, τον κ. Πέτρο Μαρτσικάλη και την κ. Ελένη Περγάνη, για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν στο πειραματικό μέρος και την εταιρεία «Ιχθυοτροφεία Παγασητικού Α.Ε.» για την ευγενική διάθεση των ψαριών.

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.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καταπόνηση (stress) στους ιχθύς έχει οριστεί ως η κατάσταση η οποία εμφανίζεται λόγω της επίδρασης των συνθηκών διαβίωσης και η οποία απειλεί την επιβίωση του οργανισμού. Οι επώδυνες διαχειριστικές παρεμβάσεις προκειμένου να πραγματοποιηθούν με ευκολία και ασφάλεια, είτε σε εργαστηριακές συνθήκες είτε σε συνθήκες εκτροφής των ιχθύων, καθιστούν αναγκαία τη χρήση των αναισθητικών ουσιών. Η αναισθησία συμβάλλει στη βελτίωση της ευζωίας των ιχθύων μειώνοντας στο ελάχιστο την καταπόνηση, με την προϋπόθεση ότι η χρήση της αναισθητικής ουσίας θα είναι ορθή. Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί πληθώρα ερευνών για την καταπόνηση που μπορεί να προκληθεί στα ψάρια από την αναισθησία. Ένα αναισθητικό πρέπει να εξασφαλίζει γρήγορη νάρκωση (<3 min) και ανάνηψη (<5 min) από την αναισθησία, να είναι ασφαλές για τα ψάρια και τον άνθρωπο, να έχει υψηλή διαλυτότητα στο γλυκό και στο θαλασσινό νερό, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς και να είναι οικονομικό και εύχρηστο. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση των σταδίων αναισθησίας και ανάνηψης με τη χρήση διαφόρων αναισθητικών ουσιών και η εκτίμηση της καταπόνησης και της πιθανής γενοτοξικής δράσης αυτών των ουσιών στα ερυθροκύτταρα και στα ηπατοκύτταρα της τσιπούρας.

Στην παρούσα έρευνα 32 άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) αναισθητοποιήθηκαν με τέσσερις διαφορετικές αναισθητικές ουσίες (τρικαΐνη, γαριφαλέλαιο, φαινοξαιθανόλη και βενζοκαΐνη) για τη διερεύνηση των σταδίων αναισθησίας και ανάνηψης αλλά και για την καταγραφή του χρόνου του κάθε σταδίου. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της comet, η οποία αποτελεί μια αξιόπιστη τεχνική, για την εκτίμηση της βλάβης του DNA, προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή γενοτοξική δράση αυτών των αναισθητικών στα ερυθροκύτταρα και ηπατοκύτταρα της τσιπούρας.

Στην παρούσα έρευνα η βενζοκαΐνη φάνηκε να έχει μεγαλύτερο χρόνο αναισθησίας σε σχέση με τα υπόλοιπα αναισθητικά, ενώ ο μέσος χρόνος αναισθησίας της τρικαΐνης βρέθηκε ~ 3 min. Τα αναισθητικά με τους μικρότερους χρόνους αναισθησίας στην τσιπούρα αποδείχτηκαν το γαριφαλέλαιο και η φαινοξυαιθανόλη με μέσους χρόνους αναισθησίας $\sim 1,5$ min και ~ 1 min αντίστοιχα. Το γαριφαλέλαιο όπως προκύπτει και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει σύντομο χρόνο αναισθησίας ανεξάρτητα από το είδος και μέγεθος ψαριού, και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην υψηλή δραστικότητα της ευγενόλης, η οποία αποτελεί το κυριότερο συστατικό του. Η φαινοξυαιθανόλη, η οποία είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αναισθητικό στην εντατική εκτροφή των ευρύαλων ψαριών, φάνηκε να έχει μικρότερο χρόνο αναισθησίας στην τσιπούρα από όλα τα υπόλοιπα αναισθητικά που εξετάστηκαν, γεγονός που έχει διαπιστωθεί και σε άλλα είδη όπως η γλώσσα, ο σαργός και το μυτάκι. Ωστόσο, η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για να αναισθητοποιηθεί το ψάρι, είναι πολλές φορές μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αναισθητικών.

Οι μικρότεροι χρόνοι ανάνηψης βρέθηκαν στην τρικαΐνη και στη βενζοκαΐνη, ενώ ακολουθούν η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο. Προκύπτει ότι οι απαιτούμενοι χρόνοι για την αναισθησία είναι αντιστρόφως ανάλογοι με τους αντίστοιχους της ανάνηψης.

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος Tail Moment (TM) για την εκτίμηση της βλάβης του DNA. Τα αναισθητικά με μεγάλους χρόνους αναισθησίας έδειξαν μεγαλύτερο TM χωρίς όμως να παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο χρόνο αναισθησίας. Το ψάρι στρεσάρεται περισσότερο, επειδή αργεί να φτάσει στον τελικό στάδιο της αναισθησίας, όπου και δεν αντιλαμβάνεται τα εξωτερικά ερεθίσματα. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν μικρές

τιμές TM, και οι περισσότερες τιμές ήταν πολύ κοντά στο μηδέν. Αυτό δηλώνει ότι το DNA των ψαριών δεν έχει υποστεί μεγάλη βλάβη λόγω έκθεσης σε διάφορα αναισθητικά, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Άρα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα αναισθητικά αυτά είναι ασφαλή για χρήση στην εντατική εκτροφή της τσιπούρας, διότι δεν προκαλούν επιπλέον καταπόνηση.

Λέξεις κλειδιά: Καταπόνηση, αναισθητικές ουσίες, τεχνική της comet, βλάβη DNA.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Γενικά.....	10
1.2 Η τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i> Linnaeus, 1758).....	10
1.3 Καταπόνηση (stress) στους ιχθύς και ο μηχανισμός αντίδρασης.....	12
1.4 Καταπόνηση (stress) στους εκτρεφόμενους ιχθύς.....	14
1.5 Αναισθησία των ιχθύων.....	15
1.6 Αναισθητικές ουσίες.....	16
1.6.1 Τρικαΐνη (MS222 ή tricaine).....	17
1.6.2 Βενζοκαΐνη (benzocaine).....	17
1.6.3 Φαινοξυαιθανόλη (2-phenoxyethanol).....	18
1.6.4 Γαριφαλέλαιο (clove oil).....	18
1.7 Αναισθησία και καταπόνηση.....	18
1.8 Η τεχνική της Comet.....	20
1.9 Σκοπός και στόχοι της παρούσας προπτυχιακής διατριβής.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 Πειραματικά ψάρια.....	22
2.2 Αναισθητικές ουσίες.....	23
2.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	24
2.4 Δειγματοληψία ιστών για την τεχνική της comet.....	27
2.5 Τεχνική της Comet.....	27
2.5.1 Απομόνωση των κυττάρων.....	29
2.5.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών.....	29
2.5.3 Λύση κυττάρων.....	30
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση.....	30
2.5.5 Ανάλυση κομητών.....	30
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1 Στάδια αναισθησίας και ανάνηψης.....	32
3.2 Χρόνοι αναισθησίας και ανάνηψης.....	33
3.3 Tail Moment (TM).....	35

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
4.1 Επίδραση αναισθητικών ουσιών στην αναισθησία και ανάνηψη των ψαριών....	39
4.2 Ανίχνευση βλάβης του DNA μετά την αναισθησία	43
4.3 Συμπεράσματα	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47
Ξένη βιβλιογραφία	47
Ελληνική βιβλιογραφία.....	52
6. ABSTRACT	53

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Από τα στοιχεία που παραθέτει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων (FAO) είναι φανερό ότι υπάρχει μια στασιμότητα ή και μείωση της αλιευτικής παραγωγής που συνοδεύεται όμως από αύξηση της παραγωγής αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες (Boyd, 2003). Σήμερα, οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο της βιομηχανίας των τροφίμων. Η εντατικοποίηση της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών, οφείλεται κυρίως στην εισαγωγή νέων τεχνολογιών, στη βελτίωση της τεχνολογίας ιχθυοτροφών, στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των εκτρεφόμενων ειδών και στην αυξανόμενη ζήτηση για τα αλιεύματα (Read and Fernandes, 2003).

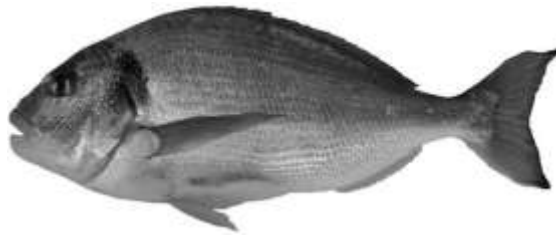
Η σύγχρονη κοινωνία έχει ανάγκη από προϊόντα διατροφής τα οποία κατά την παραγωγή τους δεν υποβαθμίζουν την ποιότητα του φυσικού περιβάλλοντος και κατά την κατανάλωσή τους είναι υγιεινά και ασφαλή. Η παραγωγή τροφίμων από τις υδατοκαλλιέργειες αποτελεί τη λύση για το πρόβλημα διατροφής της σύγχρονης ανθρώπινης κοινωνίας, διότι προσφέρει υγιεινά προϊόντα και έχει τη δυνατότητα να καλύψει το χάσμα που δημιουργείται μεταξύ παραγωγής-ζήτησης για τα αλιεύματα.

1.2 Η τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)

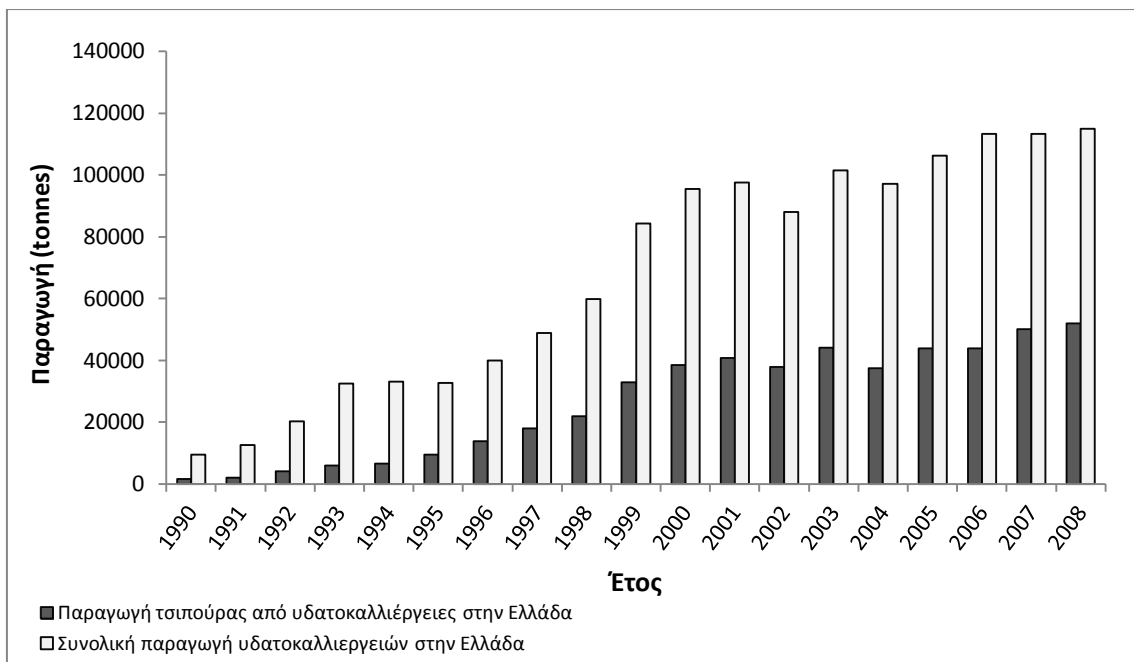
Η τσιπούρα (Εικ. 1.1) είναι ευρύαλο είδος και έχει ευρεία εξάπλωση από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα μέχρι τον Ατλαντικό Ωκεανό και νότια μέχρι τη Σενεγάλη. Ανήκει στην οικογένεια των *Sparidae* και παρουσιάζει μεγάλη εμπορική αξία και ζήτηση. Χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό αύξησης που την καθιστά πολύ

δημοφιλή στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειών. Το κρέας της τσιπούρας είναι λευκό με ευχάριστη υφή και είναι εξαιρετικής ποιότητας. Θεωρείται είδος πολυτελείας.

Οι Μεσογειακές χώρες σήμερα, αποτελούν τις κυριότερες χώρες παραγωγής της τσιπούρας στον κόσμο. Στην Ελλάδα, η τσιπούρα μαζί με το λαβράκι αποτελούν τη μεγαλύτερη μερίδα της παραγωγής αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες. Στο σχήμα 1.1 παρουσιάζονται τα στοιχεία παραγωγής της τσιπούρας και η συνολική παραγωγή αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα.



Εικόνα 1.1: Η τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)



Σχήμα 1.1: Η παραγωγή της τσιπούρας και η συνολική παραγωγή αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα (FISHSTAT Plus, Global Datasets: Total Fishery Production 1950-2008)

1.3 Καταπόνηση (stress) στους ιχθύς και ο μηχανισμός αντίδρασης

Η καταπόνηση (stress) στους ιχθύς έχει οριστεί ως η κατάσταση η οποία εμφανίζεται λόγω της επίδρασης των συνθηκών διαβίωσης και η οποία απειλεί την επιβίωση του οργανισμού. Ωστόσο, σήμερα είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι καταστάσεις οι οποίες δεν απειλούν τη ζωή αλλά επιδρούν αρνητικά στη διατροφή, στην αύξηση, στην αναπαραγωγή, στη φυσιολογία και στη δραστηριότητα του οργανισμού είναι στρεσογόνες (Ross and Ross, 2008).

Οι ιχθύες ως αντίδραση σε έναν παράγοντα stress ανταποκρίνονται με μια σειρά από βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές (Basu *et al.*, 2001). Όταν οι ιχθύες εκτίθενται σε συνθήκες stress, η φυσιολογική αντίδραση αρχίζει με την αναγνώριση της απειλής από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Barton, 2002). Ο μηχανισμός αντίδρασης των ιχθύων στο stress περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την πρωτογενή, τη δευτερογενή και την τριτογενή αντίδραση.

Η φάση της πρωτογενούς αντίδρασης περιλαμβάνει την γρήγορη απελευθέρωση των ορμονών που προκαλούν stress, των κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών (π.χ. κορτιζόλη) στο κυκλοφορικό σύστημα. Οι κατεχολαμίνες εκκρίνονται από το άνω-νεφρικό σύστημα (χρωμιόφιλος ιστός) που βρίσκεται στον εμπρόσθιο νεφρό των τελεόστεων ιχθύων καθώς επίσης και από τις απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η κορτιζόλη εκκρίνεται από το ενδο-νεφρικό σύστημα ως αντίδραση σε διάφορες ορμόνες της υπόφυσης, αλλά κυρίως ως αντίδραση στην ορμόνη ACTH (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη) (Iwama *et al.*, 2004).

Η φάση της δευτερογενούς αντίδρασης περιλαμβάνει τις διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές που σχετίζονται με το stress οι οποίες σε μεγάλο βαθμό προκαλούνται από τις στρεσογόνες ορμόνες. Οι στρεσογόνες αυτές ορμόνες

ενεργοποιούν έναν αριθμό διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών που οδηγούν σε αλλαγές στη βιοχημική σύσταση του αίματος. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της κατάστασης stress και πιθανόν είναι οι συνηθέστεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της δευτερογενούς αντίδρασης των ιχθύων στους στρεσογόνους παράγοντες (Iwama *et al.*, 2004).

Η παραγωγή της γλυκόζης μέσω του stress, βοηθά τον οργανισμό παρέχοντάς του ενεργειακά υποστρώματα στους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, τα βράγχια και τους μύες, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες. Το ήπαρ είναι το κυριότερο όργανο για την παραγωγή της γλυκόζης μέσω της γλυκογένεσης και γλυκονογένεσης. Η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη σύμφωνα με τους Vijayan and Moon (1994) παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση παραγωγής της γλυκόζης στους ιχθύς και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των καταστάσεων stress μέσω της αύξησης στη συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος.

Η φάση της τριτογενούς αντίδρασης, η ύπαρξη της οποίας προϋποθέτει τη συνέχιση της εφαρμογής του στρεσογόνου παράγοντα ή την ανεπιτυχή προσαρμογή των ιχθύων στον παράγοντα αυτό, περιλαμβάνει συνήθως τη μείωση του ρυθμού αύξησης, τη διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας και την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί ταχύτατη εξάντληση και θάνατος των ιχθύων, ενώ σε άλλες η εξάντληση επέρχεται βραδύτατα και δεν αποκλείεται η επιβίωσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην πρώτη περίπτωση το stress καλείται οξύ (acute) και στη δεύτερη χρόνιο (chronic) (Παπουτσόγλου, 1998).

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του stress στους ιχθύς.

Πίνακας 1.1: Κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του stress στους ιχθύς (τροποποιημένο από Barton και Iwama, 1991)

Δείκτες πρωτογενούς αντίδρασης	
	Κατεχολαμίνες πλάσματος Κορτικοστεροειδή πλάσματος ACTH πλάσματος
Δείκτες δευτερογενούς αντίδρασης	
Μεταβολικοί δείκτες	Γλυκόζη πλάσματος Γαλακτικό οξύ πλάσματος Γλυκογόνο του ήπατος και των μυών Χοληστερόλη πλάσματος
Αιματολογικοί δείκτες	Αιματοκρίτης Αριθμός ερυθροκυττάρων Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων Αιμογλοβίνη Νάτριο πλάσματος Κάλιο πλάσματος Πρωτεΐνη πλάσματος
Δομικοί δείκτες	Κύτταρα ενδο-νεφρικού συστήματος Μορφολογία γαστρικών ιστών Οργανοσωματικοί δείκτες
Δείκτες τριτογενούς αντίδρασης	
	Αύξηση Μεταβολικός ρυθμός Ανθεκτικότητα στις ασθένειες Θερμική ανοχή Ανοχή στην υποξία Κολυμβητική ικανότητα Αναπαραγωγική ικανότητα

1.4 Καταπόνηση (stress) στους εκτρεφόμενους ιχθύς

Η ευζωία των ψαριών και γενικότερα όλων των ζώων είναι μια έννοια που δηλώνει μια ανώδυνη και μη στρεσογόνα κατάσταση διαβίωσης. Η απουσία τέτοιας σταθερότητας ορίζεται ως κατάσταση stress. Σχεδόν όλοι οι χειρισμοί που πραγματοποιούνται σε επίπεδο ιχθυοκαλλιέργειας θεωρούνται στρεσογόνοι, με σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή και στην ποιότητα των εκτρεφόμενων οργανισμών.

Η μεταβολή των τιμών των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού (αλατότητα, θερμοκρασία, ποσότητα διαλυμένου οξυγόνου, pH κ.λπ.), διάφοροι τύποι χειρισμών

των ιχθύων (εξαλίευση, μεταφορά, διαλογή μεγέθους, ζύγισμα, αιμοληψία, εμβολιασμός κ.λπ.), η αυξημένη πυκνότητα εκτροφής, η ύπαρξη ακατάλληλου περιβάλλοντος διαβίωσης (υποβαθμισμένη ποιότητα νερού), η διαδικασία της διατροφής (ποιότητα τροφής, συχνότητα γευμάτων) και η αναπαραγωγική διαδικασία των οργανισμών είναι οι σημαντικότερες αιτίες πρόκλησης stress (Παπουτσόγλου, 1998).

Οι επιπτώσεις του stress στους εκτρεφόμενους οργανισμούς μπορεί να είναι η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, μείωση του ρυθμού αύξησης, φυσικός τραυματισμός ή ακόμα και θάνατος. Ωστόσο, οι αρνητικές αυτές επιπτώσεις εξαρτώνται από την φύση, τη δριμύτητα, τη διάρκεια και τη συχνότητα του στρεσογόνου παράγοντα (Cuesta *et al.*, 2003).

1.5 Αναισθησία των ιχθύων

Η αναισθησία στοχεύει κυρίως στον περιορισμό της κινητικότητας των ιχθύων. Η εκτροφή των ψαριών απαιτεί μεγάλο αριθμό χειριστικών παρεμβάσεων οι οποίες προκειμένου να πραγματοποιηθούν με ευκολία και ασφάλεια, καθιστούν αναγκαία τη χρήση των αναισθητικών ουσιών.

Η χρήση αναισθητικών ουσιών διευκολύνει τους χειρισμούς και μειώνει την καταπόνηση που προκαλείται κατά την εκτέλεσή τους, ενώ επιτρέπει την εκτέλεση επώδυνων διαδικασιών. Χειρισμοί, όπως η διαλογή μεγέθους, το ζύγισμα, ο εμβολιασμός, η μεταφορά και η τεχνητή γονιμοποίηση, απαιτούν τη χρήση αναισθητικών ουσιών σε δόσεις, οι οποίες ανάλογα με την περίπτωση, εξασφαλίζουν από ελαφρά ηρεμία μέχρι βαθιά χειρουργική αναισθησία (Τσαντήλας και συν., 2005).

Το ιδανικό αναισθητικό για τα ψάρια πρέπει να εξασφαλίζει γρήγορη νάρκωση (<3 min) και ανάνηψη (<5 min) από την αναισθησία, να είναι ασφαλές για τα ψάρια και τον άνθρωπο, να έχει υψηλή διαλυτότητα στο γλυκό και στο θαλασσινό νερό, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς και να είναι οικονομικό και εύχρηστο (Marking and Meyer, 1985). Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια κάθε αναισθητικής ουσίας εξαρτάται από το είδος και το στάδιο ζωής ενός ψαριού και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (King *et al.*, 2005).

Οι αναισθητικές ουσίες προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων και εισέρχονται γρήγορα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η ανάνηψη από την αναισθησία γίνεται με την επαναφορά των ψαριών σε νερό απαλλαγμένο από την αναισθητική ουσία. Η ανταπόκριση των ψαριών στα αναισθητικά εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος και το σωματικό βάρος του ψαριού, την αναλογία μεταξύ του σωματικού βάρους και της επιφάνειας των βραγχίων του, τη λιποπεριεκτικότητα, το φύλο, τη σεξουαλική ωριμότητα, τη φυσική κατάσταση και την κατάσταση της υγείας του, αλλά και τη θερμοκρασία, το pH και την περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβιεί σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο (Τσαντήλας και συν., 2005). Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας των ιχθύων μπορούν να διακριθούν διάφορα επίπεδα ή στάδια. Κάθε στάδιο εξαρτάται από τη δόση του αναισθητικού και το χρόνο έκθεσης σε αυτό.

1.6 Αναισθητικές ουσίες

Υπάρχουν πολλές αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Οι πιο διαδεδομένες αναισθητικές ουσίες είναι η τρικαΐνη (MS222 ή tricaine), η βενζοκαΐνη (benzocaine), η φαινοξυαιθανόλη (2-phenoxyethanol), η κινναλδίνη (quinaldine), η θειική κινναλδίνη (quinaldine sulphate), το γαριφαλέλαιο

(clove oil) και η μετομιδάτη (metomidate). Παρακάτω ακολουθεί σύντομη περιγραφή των αναισθητικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

1.6.1 Τρικαΐνη (MS222 ή tricaine)

Η τρικαΐνη έχει τη μορφή λευκής κρυσταλλικής σκόνης που μπορεί να διαλυθεί στο νερό και είναι η μόνη αναισθητική ουσία που έχει άδεια από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA - Food and Drug Administration) των ΗΠΑ για χρήση σε ψάρια. Είναι εύχρηστη και θεωρείται ασφαλής για τα ψάρια και το χρήστη, έχει όμως υψηλό κόστος αγοράς και απαιτείται χρόνος αναμονής περίπου 21 ημερών μετά τη χρήση της. Η τρικαΐνη μειώνει το pH του νερού δημιουργώντας όξινες συνθήκες που μπορεί να ενοχλήσει τα ψάρια και να προκαλέσει επιβλαβείς παρενέργειες. Επίσης, έχουν αναφερθεί μια σειρά από φυσιολογικές επιπτώσεις που προκαλούνται από την τρικαΐνη όπως είναι αυξημένη τιμή του αιματοκρίτη, «διόγκωση» ερυθροκυττάρων, υποξία, υπεργλυκαιμία, μεταβολή ηλεκτρολυτών αίματος, των ορμονών, της χοληστερόλης, της ουρίας, κ.ά. (Ross and Ross, 2008).

1.6.2 Βενζοκαΐνη (benzocaine)

Η βενζοκαΐνη είναι ουσία χημικά παρόμοια με την τρικαΐνη, αλλά είναι σχεδόν αδιάλυτη στο νερό και πρέπει πρώτα να διαλυθεί είτε σε ακετόνη είτε σε αιθανόλη. Είναι όμως πιο οικονομική, μετά τη χρήση της απαιτείται χρόνος αναμονής μόνο 24 ωρών και θεωρείται αρκετά ασφαλής για τα ψάρια και τον άνθρωπο. Η αποτελεσματικότητα της βενζοκαΐνης δεν επηρεάζεται από τη σκληρότητα ή το pH του νερού (Ross and Ross, 2008).

1.6.3 Φαινοξυαιθανόλη (2-phenoxyethanol)

Η φαινοξυαιθανόλη είναι ένα άχρωμο και ελαιούχο υγρό με ελάχιστη αρωματική οσμή και διαλύεται εύκολα στο νερό. Είναι οικονομική, εύχρηστη, αρκετά ασφαλής για τα ψάρια, αν και ίσως όχι πάντα ασφαλής για το χρήστη, ενώ τα διαλύματά της έχουν, πέραν της αναισθητικής, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Είναι το ευρέως χρησιμοποιούμενο αναισθητικό στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια των ευρύαλων ιχθύων.

1.6.4 Γαριφαλέλαιο (clove oil)

Το γαριφαλέλαιο είναι ελαιώδες υγρό το οποίο περιέχει τις δραστικές ουσίες ευγενόλη και ισοευγενόλη. Οι δραστικές ουσίες προέρχονται από τα φυτά του γένους *Syzygium* sp. Είναι οικονομικό και εύχρηστο, έχει αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, θεωρείται αρκετά ασφαλές για τα ψάρια και τον άνθρωπο και δεν απαιτείται χρόνος αναμονής μετά τη χρήση του. Ένα από τα μειονεκτήματα του γαριφαλέλαιου είναι ότι δεν συστήνεται η χρήση του στην εξαλίευση ψαριών λόγω των προβλημάτων γεύσης που μπορεί να προκαλέσει στο τελικό προϊόν (Ross and Ross, 2008).

1.7 Αναισθησία και καταπόνηση

Η αναισθησία των ιχθύων κατά τη διάρκεια επίπονων διεργασιών, είτε σε εργαστηριακές συνθήκες είτε σε συνθήκες εκτροφής, συμβάλλει στη βελτίωση της ευζωίας τους μειώνοντας στο ελάχιστο την καταπόνηση, με την προϋπόθεση ότι η χρήση της αναισθητικής ουσίας θα είναι ορθή. Ωστόσο, είναι πιθανό η ίδια η αναισθητική ουσία να προκαλέσει stress στους ιχθύς με διάφορες παρενέργειες (de Miranda Cabral Gontijo *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2007).

Οι Bressler and Ron (2004) αναφέρουν ότι οι αναισθητικές ουσίες έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν stress στα ψάρια όταν ο χρόνος έκθεσης είναι αρκετά εκτεταμένος. Επίσης, η βαθιά αναισθησία μπορεί να ενεργοποιήσει την αντίδραση στο stress, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και στην αύξηση της ευαισθησίας στις ασθένειες (Bressler and Ron, 2004). Οι Ortuno *et al.* (2002) επίσης υποστηρίζουν ότι η βενζοκαΐνη και η φαινοξυαιθανόλη, κάτω από ειδικές πειραματικές συνθήκες, έχουν κατασταλτική δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα της τσιπούρας.

Σύμφωνα με τους Barton and Peter (1982) η τρικαΐνη δρα ως στρεσογόνος παράγοντας στην πέστροφα αυξάνοντας τα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα. Οι Zahl *et al.* (2009) επίσης αναφέρουν ότι η έκθεση σε αναισθητικές ουσίες τρικαΐνη, βενζοκαΐνη και γαριφαλέλαιο, προκαλεί αντίδραση stress στον σολομό (*Salmo salar* Linnaeus, 1758), στον υπόγλωσσο (*Hippoglossus hippoglossus* Linnaeus, 1758) και στον μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) αυξάνοντας τα επίπεδα της κορτιζόλης. Αυτή την υπόθεση επιβεβαιώνει και η μελέτη των Bressler and Ron (2004) στην τσιπούρα (*S. aurata*), οι οποίοι αναφέρουν ότι τα επίπεδα της κορτιζόλης και της γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται μετά από έκθεση στις αναισθητικές ουσίες βενζοκαΐνη και γαριφαλέλαιο ως αντίδραση stress.

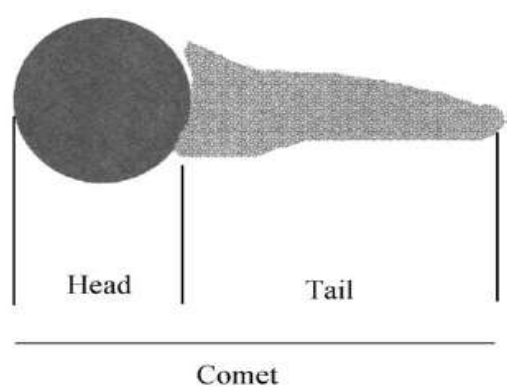
Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης και της γλυκόζης στο αίμα χρησιμοποιούνται συνήθως ως δείκτες stress στα ψάρια επειδή έχει αποδειχθεί ότι οι τιμές τους μεταβάλλονται ως μηχανισμός αντίδρασης των ψαριών στο stress και επίσης είναι εύκολα μετρήσιμες παράμετροι. Παρά την εκτεταμένη χρήση αυτών των δεικτών και της αποδοχής τους, έχουν αναφερθεί διαφωνίες στα αποτελέσματα διάφορων πειραματικών ερευνών, που σχετίζονται με τους απροσδιόριστους και ανεξέλεγκτους

παράγοντες που μπορούν να μεταβάλλουν την αντίδραση στην έκκριση της κορτιζόλης και της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. Οι περισσότεροι από εκείνους τους παράγοντες δεν θεωρούνται ως άμεσοι παράγοντες stress, αλλά έχουν επίδραση στην ένταση του μηχανισμού αντίδρασης, που τους καθιστά πηγή σφάλματος (Porchas *et al.*, 2009). Σύμφωνα με τους Deriggi *et al.* (2006), η σύλληψη των ψαριών και η μεταφορά τους σε ένα πειραματικό λουτρό για αναισθησία, είναι αρκετή για να προκληθεί έκκριση κατεχολαμινών και επομένως αύξηση τιμών των αιματολογικών παραμέτρων όπως της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

1.8 Η τεχνική της Comet

Η τεχνική της comet (ανάλυση comet - κομητών) εισήχθη για πρώτη φορά από τους Östling and Johanson το 1984, ως μια τεχνική μικροηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε απομονωμένα κύτταρα (Fairbairn *et al.*, 1995). Ωστόσο, οι ουδέτερες (neutral) συνθήκες που χρησιμοποίησαν, επέτρεπαν την ανίχνευση μόνο των θραυσμάτων του δίκλωνου DNA. Αργότερα, η τεχνική προσαρμόστηκε σε αλκαλικές συνθήκες (pH>13) από τους Singh *et al.* το 1988, οι οποίοι βελτίωσαν την τεχνική. Από την έναρξη της χρήσης της, η τεχνική της comet έχει τροποποιηθεί σε διάφορα βήματα (π.χ. λύση, ηλεκτροφόρηση) για να καταστεί κατάλληλη για την ανίχνευση βλαβών σε διαφορετικά κύτταρα. Η τεχνική της comet αποτελεί σήμερα ένα απλό, ευπροσάρμοστο, γρήγορο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ανίχνευση και επιδιόρθωση της βλάβης του DNA, ποσοτικά και ποιοτικά, σε απομονωμένα ευκαρυωτικά αλλά και σε μερικά προκαρυωτικά κύτταρα και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς που κυμαίνονται από τη γενετική τοξικολογία ως την ανθρώπινη επιδημιολογία (Dhawan *et al.*, 2009).

Στην τεχνική αυτή τα απομονωμένα κύτταρα ενσωματώνονται σε λεπτή στρώση αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ακολουθεί η λύση των κυττάρων και η αποπεριέλιξη του DNA. Στη συνέχεια γίνεται η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH, η ουδετεροποίηση (neutralizing) και στο τέλος η χρώση με φθορίζουσα χρωστική. Τα κύτταρα με αυξημένη βλάβη DNA επιδεικνύουν μια αυξημένη μετακίνηση του γενετικού υλικού στη διεύθυνση της ηλεκτροφόρησης και η μορφή τους ομοιάζει με κομήτες. Η έκταση της βλάβης του DNA ποσοτικοποιείται μετρώντας την μετατόπιση του γενετικού υλικού ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου και στην προκύπτουσα «ουρά» (Εικ. 1.2). Οι μετρήσεις γίνονται συνήθως με ανάλυση εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και κατάλληλου λογισμικού προγράμματος (Collins, 2004).



Εικόνα 1.2: Κεφαλή (head) και ουρά (tail) των κομητών

1.9 Σκοπός και στόχοι της παρούσας προπτυχιακής διατριβής

Η χρήση αναισθητικών είναι ευρέως διαδεδομένη στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια κατά τη διάρκεια χειρισμών. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση των σταδίων αναισθησίας και ανάνηψης με τη χρήση διαφόρων αναισθητικών ουσιών και η εκτίμηση της καταπόνησης και της πιθανής γενοτοξικής δράσης αυτών των ουσιών στα ερυθροκύτταρα και στα ηπατοκύτταρα της τσιπούρας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στον Πειραματικό Ιχθυογεννητικό Σταθμό του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ενώ οι μοριακές αναλύσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν στον εργαστηριακό χώρο της Γενετικής του ιδίου Τμήματος.

2.1 Πειραματικά ψάρια

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα μεταφέρθηκαν στον πειραματικό ιχθυογεννητικό σταθμό του Τμήματος από μονάδα εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας που εδρεύει στον Παγασητικό Κόλπο. Τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές δεξαμενές κυλινδρικού τύπου και χωρητικότητας 500 l και εγκλιματίστηκαν για περίπου ένα μήνα στον πειραματικό σταθμό πριν την εκτέλεση του πειράματος όπου και απέκτησαν μέσο βάρος $69,45 \pm 5,3$ g. Το θαλασσινό νερό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από την ευρύτερη περιοχή του Παγασητικού Κόλπου και ανακυκλωνόταν κατά τη διάρκεια της ημέρας περνώντας με τη βοήθεια των αντλιών από μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο και στη συνέχεια από υπεριώδη ακτινοβολία. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού (Πίν. 2.1) όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και το διαλυμένο οξυγόνο, ήταν ίδια για όλες τις δεξαμενές.

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του θαλασσινού νερού στις δεξαμενές πειράματος

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού	
Θερμοκρασία	~21 °C
pH	7,4
Συγκέντρωση αμμωνίας (NH ₃)	0,5-2 ppm
Αλατότητα	3,4 g/l
Διαλυμένο οξυγόνο	5-7 ml/l

2.2 Αναισθητικές ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις αναισθητικές ουσίες, τρικαΐνη, γαριφαλέλαιο, φαινοξυαιθανόλη και βενζοκαΐνη για τη διαδικασία της αναισθησίας των ψαριών. Οι δραστικές συγκεντρώσεις των αναισθητικών ουσιών ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία (Πίν. 2.2).

Πίνακας 2.2: Οι δραστικές συγκεντρώσεις των αναισθητικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Αναισθητική ουσία	Συγκέντρωση	Βιβλιογραφική αναφορά
Τρικαΐνη	70 mg/l	Ross and Ross, 2008
Γαριφαλέλαιο	50 mg/l	Mylonas <i>et al.</i> , 2005
Φαινοξυαιθανόλη	500 mg/l	Mylonas <i>et al.</i> , 2005
Βενζοκαΐνη	37 mg/l	Bressler and Ron, 2004

2.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα αναισθητικά προστέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές πλαστικές δεξαμενές με 10 l θαλασσινό νερό. Στη συνέχεια τα ψάρια μεταφέρθηκαν στις πλαστικές δεξαμενές για την αναισθησία. Η αναισθησία γινόταν κάθε φορά σε ένα ψάρι για κάθε αναισθητικό. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για κάθε ένα από τα τέσσερα αναισθητικά. Το πειραματικό σχέδιο της παρούσας έρευνας παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3. Ο σχεδιασμός του πειράματος έγινε σύμφωνα με τον πίνακα των λατινικών τετραγώνων (Latin Square). Η κάθε γραμμή του πίνακα αντιστοιχεί σε μια δεξαμενή. Οι χαρακτήρες Α, Β, Γ, Δ συμβολίζουν τις 4 αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, όπου Α→ Τρικαΐνη, Β→ Γαριφαλέλαιο, Γ→ Φαινοξυαιθανόλη, Δ→ Βενζοκαΐνη. Η κάθε στήλη του πίνακα δείχνει τη σειρά αλίευσης του κάθε ψαριού από κάθε δεξαμενή και επίσης τη σειρά χορήγησης των αναισθητικών ουσιών. Η χρήση του πίνακα λατινικών τετραγώνων βοηθά στη μείωση του στατιστικού σφάλματος.

Πίνακας 2.3: Πειραματικό σχέδιο της μελέτης - Πίνακας Λατινικών Τετραγώνων (Latin Square)

		Σειρά αλίευσης/μεταχείρισης ψαριών			
		1	2	3	4
Δεξαμενή	1	A	B	Γ	Δ
	2	B	Γ	Δ	A
	3	Γ	Δ	A	B
	4	Δ	A	B	Γ

Μετά την ολοκλήρωση της αναισθησίας για κάθε ψάρι, ακολούθησε ανάνηψη και δειγματοληψία ιστών για την τεχνική της comet. Συνολικά για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 32 άτομα τσιπούρας. Μετά την αναισθησία όλα τα ψάρια μετρήθηκαν και ζυγίστηκαν. Στον Πίνακα 2.4 συνοψίζονται τα στοιχεία μήκους και βάρους των ατόμων τσιπούρας ανάλογα με τη μεταχείριση.

Πίνακας 2.4: Το μέσο σταθερό μήκος, το μέσο ολικό μήκος και το μέσο βάρος των ατόμων τσιπούρας για κάθε μεταχείριση

	Αναισθητική ουσία	SL - Σταθερό μήκος (mm)	TL - Ολικό μήκος (mm)	Βάρος (g)
Αναισθησία - Δειγματοληψία	Τρικάϊνη	142,5 (±7,5)	167,5 (±8,78)	70,175 (±11,26)
	Γαριφαλέλαιο	145,25 (±7,07)	166,25 (±7,46)	69,48 (±10,23)
	Φαινοξυαιθανόλη	136,25 (±9,31)	158,75 (±7,74)	65,42 (±15,48)
	Βενζοκαΐνη	144,25 (±6,78)	169,25 (±8,4)	72,725 (±9,24)
Αναισθησία - Ανάνηψη	Τρικάϊνη	144,75 (±7,8)	168,75 (±10,07)	71,5 (±10,8)
	Γαριφαλέλαιο	132,25 (±3,17)	153,75 (±5,54)	54,1 (±4,9)
	Φαινοξυαιθανόλη	133,5 (±7,89)	155,25 (±8,5)	54,775 (±8,9)
	Βενζοκαΐνη	150,25 (±8,47)	177,25 (±10,8)	85,345 (±13,8)

Στα 16 πρώτα ψάρια τα οποία αναισθητοποιήθηκαν και με τα τέσσερα αναισθητικά, όπως περιγράφηκε παραπάνω, έγινε ανάνηψη. Τόσο τα στάδια της αναισθησίας (Πίν. 2.5) όσο και τα στάδια της ανάνηψης (Πίν. 2.6) παρατηρήθηκαν σε κάθε ψάρι ξεχωριστά και για κάθε ένα από τα αναισθητικά που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να καταγραφεί ο χρόνος του κάθε σταδίου. Στα υπόλοιπα 16 ψάρια, ακολούθησε

δειγματοληψία, η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στο υποκεφάλαιο 2.4, προκειμένου να υπολογιστεί η έκταση της βλάβης στο DNA, με την τεχνική της comet.

Πίνακας 2.5: Τα στάδια αναισθησίας των ιχθύων (τροποποιημένο από Keene *et al.*, 1998)

Στάδιο	Κατάσταση	Χαρακτηριστικά
1	Ηρέμηση	Μειωμένη αντίδραση στα εξωτερικά ερεθίσματα, μειωμένος ρυθμός βραγχοκαλυμμάτων, κανονική ισορροπία
2	Βαθιά ηρέμηση	Έλλειψη αντίδρασης στα εξωτερικά ερεθίσματα, μείωση ρυθμού βραγχοκαλυμμάτων, κανονική ισορροπία
3	Μερική απώλεια ισορροπίας	Μερική απώλεια μυϊκού τόνου και κολυμβητικής ικανότητας, γρήγορος ρυθμός βραγχοκαλυμμάτων
4	Ολική απώλεια ισορροπίας	Ολική απώλεια μυϊκού τόνου και κολυμβητικής ικανότητας, μειωμένος αλλά κανονικός ρυθμός βραγχοκαλυμμάτων,
5	Αναισθησία	Ολική απώλεια κινητικότητας και αντίδρασης στα εξωτερικά ερεθίσματα, μειωμένος και ακανόνιστος ρυθμός βραγχοκαλυμμάτων

Πίνακας 2.6: Τα στάδια ανάνηψης των ιχθύων (τροποποιημένο από Keene *et al.*, 1998)

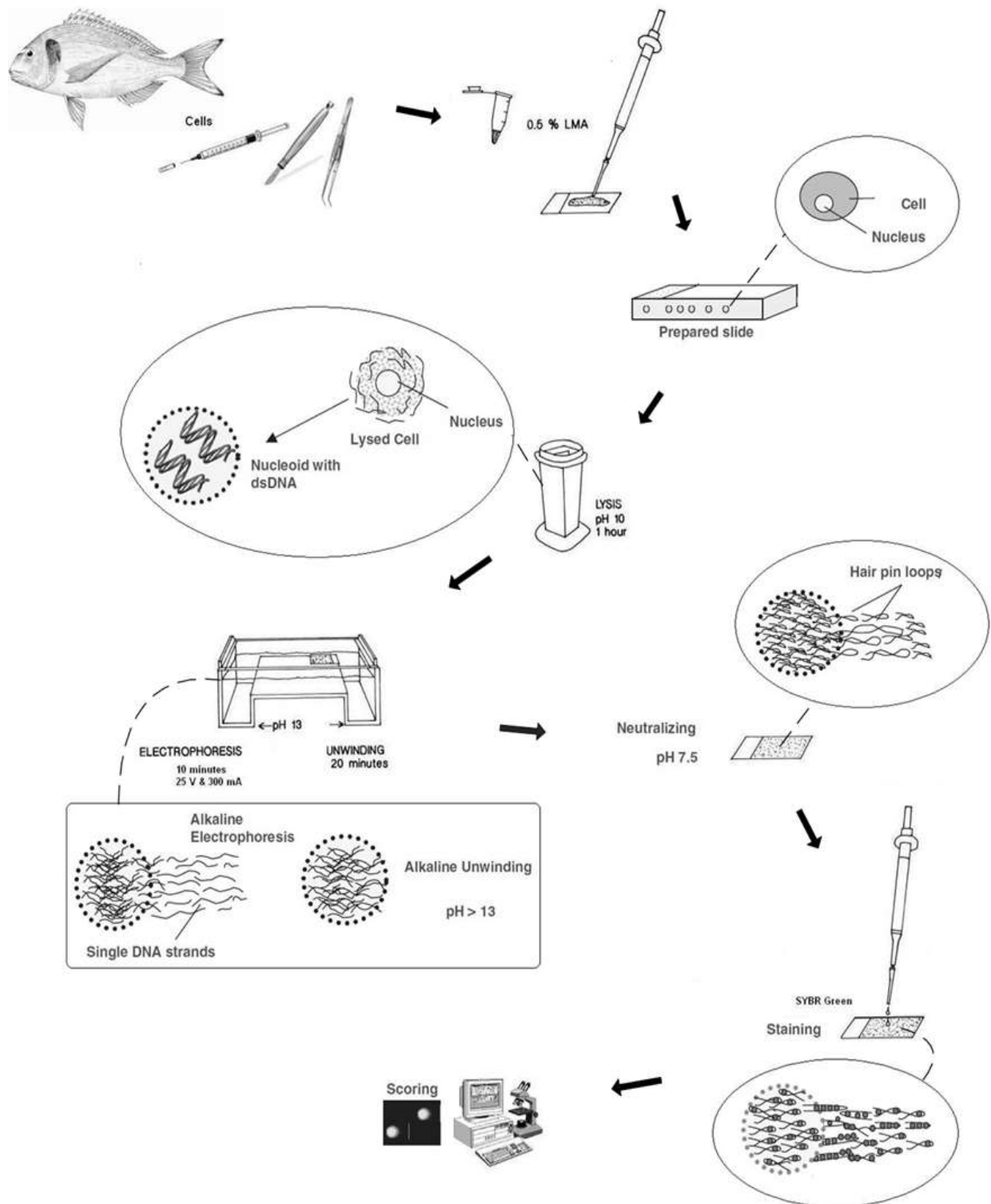
Στάδιο	Κατάσταση
1	Ανάκτηση ρυθμού βραγχοκαλυμμάτων
2	Μερική ανάκτηση ισορροπίας και κολυμβητικής ικανότητας
3	Ολική ανάκτηση ισορροπίας
4	Ανάκτηση αντίδρασης στα εξωτερικά ερεθίσματα
5	Ολική ανάνηψη, κανονική κολύμβηση

2.4 Δειγματοληψία ιστών για την τεχνική της comet

Μετά την αναισθησία των ατόμων τσιπούρας ακολούθησε η δειγματοληψία των ιστών για την τεχνική της comet. Σε κάθε άτομο τσιπούρας έγινε αιμοληψία και λήφθηκε το ήπαρ. 2 μl αίματος από κάθε ψάρι τοποθετήθηκαν σε 1 ml PBS μέσα σε πλαστική κυβέτα. Το ήπαρ τοποθετήθηκε αμέσως μετά την εκτομή σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon που περιείχε 10 ml διαλύματος HBSS (Hank's balanced salt solution). Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στον πάγο έως ότου μεταφερθούν στο εργαστήριο για τις μοριακές αναλύσεις.

2.5 Τεχνική της Comet

Η τεχνική της comet η οποία χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια. Στην Εικόνα 2.1 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της τεχνικής.



Εικόνα 2.1: Διάγραμμα ροής της τεχνικής comet

2.5.1 Απομόνωση των κυττάρων

Ήπαρ: Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση του ήπατος με το HBSS. Στη συνέχεια έγιναν ενέσεις κολαγενάσης στον ιστό. Η κολαγενάση είναι ένζυμο που καταστρέφει τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου, το οποίο αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στους ζωικούς οργανισμούς. Μετά τη δράση της κολαγενάσης για 15 min, ο ιστός τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια. Ακολούθησε η ανάδευση του αιωρήματος για 30 min. Έπειτα το ομογενοποιημένο πλέον διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάζας, τοποθετήθηκε σε σωλήνα Falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 5 min. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από το ομογενοποιημένο διάλυμα και προστέθηκε νέα ποσότητα HBSS. Η διαδικασία με τις πλύσεις επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές και στο τέλος της δεύτερης πλύσης προστέθηκαν 10 ml PBS (Phosphate buffered saline) στον σωλήνα Falcon με το ομογενοποιημένο διάλυμα.

Αίμα: Η απομόνωση των ερυθροκυττάρων είναι πιο απλή διαδικασία σε σχέση με τα ηπατοκύτταρα. Οι κυβέτες που περιείχαν 2 ml αίματος σε 1 ml PBS μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο γενετικής και αμέσως μετά έγινε η προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών (όπως περιγράφεται παρακάτω) και η ενσωμάτωση των ερυθροκυττάρων στην αгарόζη επάνω στην πλάκα.

2.5.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες βρίσκονταν σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ πριν τη χρήση τους για να διευκολυνθεί η πήξη της αгарόζης. Ακολούθησε η εμφύσηση των παγωμένων πλακών σε αгарόζη συγκέντρωσης 1% σε PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 50 ml κυτταρικού αιωρήματος σε 50 ml αгарόζης (low melt point agarose) και το μείγμα

αυτό τοποθετήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία περιείχε αρχική στρώση αγαρόζης.

2.5.3 Λύση κυττάρων

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, μετά την σταθεροποίηση της αγαρόζης, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα λύσης (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% Triton-X και 10% DMSO-Dimethylsulfoxide). Παρέμειναν στο διάλυμα για 1 hr και στους 4 °C για να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα να καταστραφεί η κυτταρική μεμβράνη και να απελευθερωθεί το DNA.

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση

Μετά τη λύση των κυττάρων, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση των αλάτων και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (NaOH 0,075 M, EDTA 1 mM, pH>12). Πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης παρέμειναν εκεί για 20 min με σκοπό την αποπεριέλιξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση των θραυσμάτων του μονόκλωνου DNA. Ύστερα ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση 25 V και 300 mA που είχε διάρκεια 10 min. Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με διάλυμα ουδετεροποίησης (neutralization) (Tris 0,4 M, pH=7,5) για να επανέλθει το DNA σε δίκλωνη μορφή, έτσι ώστε να δράσει η φθορίζουσα χρωστική.

2.5.5 Ανάλυση κομητών

Η χρώση του DNA έγινε με τη χρωστική SYBR Green I, η οποία χρωματίζει τους πυρήνες με έντονο φωτεινό πράσινο χρώμα. Η ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε

αντικειμενοφόρο πλάκα είναι περίπου 20 μ l. Περίπου 100 πυρήνες φωτογραφήθηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η επεξεργασία και η ανάλυση (scoring) των πυρήνων έγινε με το λογισμικό CASP v.1.2.2 (Comet Assay Software Project).

Οι παράμετροι που υπολογίζει το λογισμικό CASP χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της βλάβης του DNA. Το TM είναι η παράμετρος που χρησιμοποιείται πιο συχνά. Το TM ορίζεται ως το μήκος της ουράς του DNA που έχει απομακρυνθεί από τον πυρήνα επί το ποσοστό του DNA, το οποίο βρίσκεται στην ουρά. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TM (μεγάλη τιμή του TM σημαίνει ότι ο κομήτης έχει μεγάλη και γεμάτη ουρά) από ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερη βλάβη έχει υποστεί το DNA του συγκεκριμένου δείγματος.

2.6 Στατιστική ανάλυση

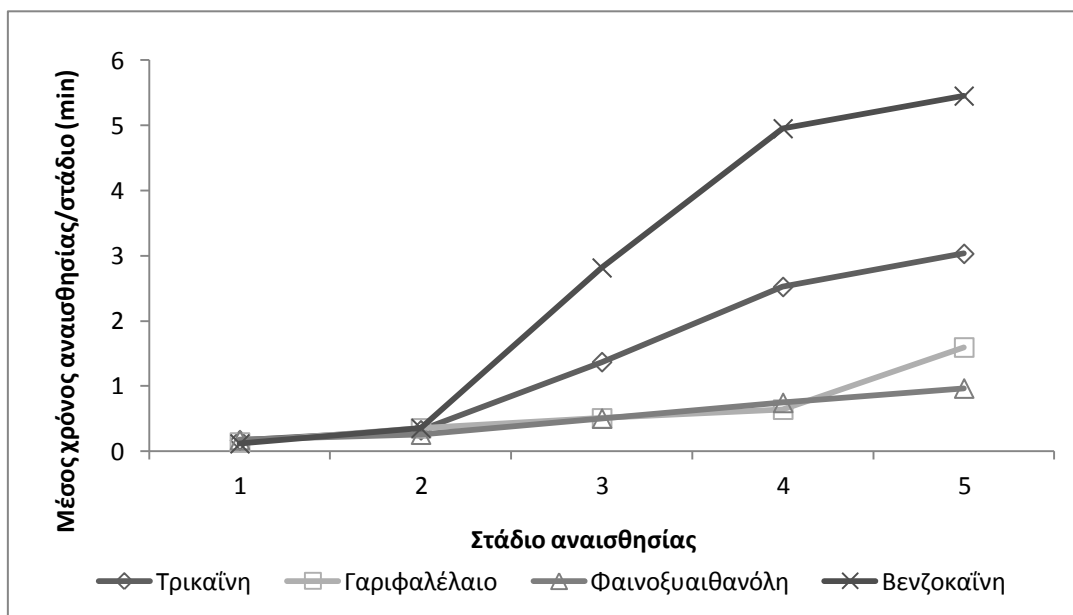
Στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα TM για κάθε μεταχείριση. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διασπορών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του Levene και για τον έλεγχο της κανονικότητας το κριτήριο των Kolmogorov-Smirnov.

Επειδή στα δεδομένα οι μέσες τιμές ήταν ανάλογες των διακυμάνσεων και, οι τιμές ήταν πολύ κοντά στο 0, δηλ. πολύ μικρές, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $(\sqrt{x} + 0,5)$ για τη μετατροπή των δεδομένων (Zar, 1984). Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο (GLM - UniANOVA) με την παραμετροποίηση του μοντέλου σε συγκρίσεις μέσω των όρων ανά ζεύγη (main effects). Για τις πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Tukey HSD. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha=0,05$.

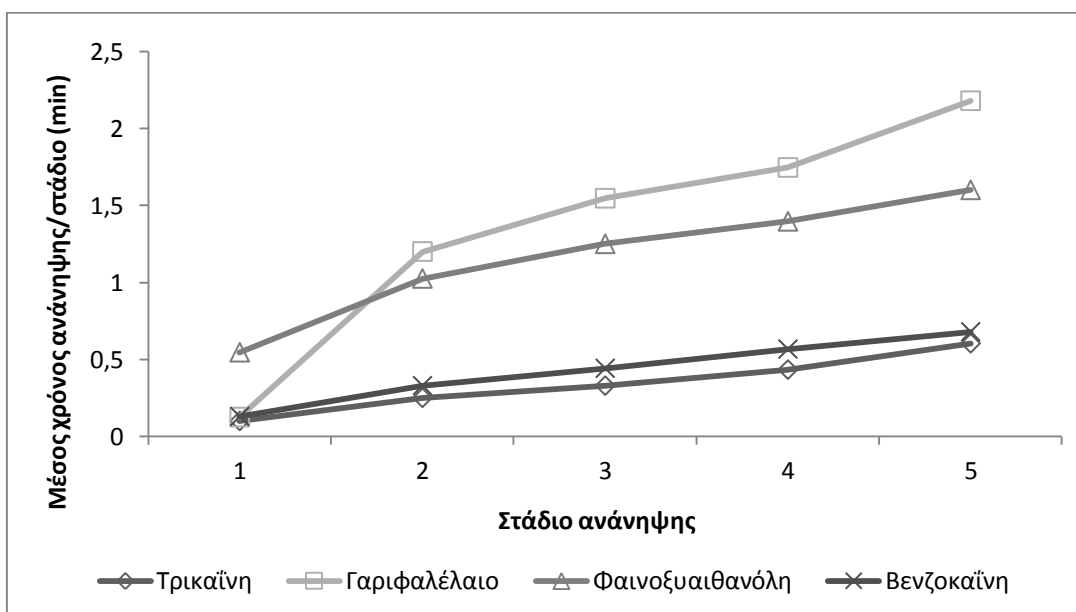
3. Αποτελέσματα

3.1 Στάδια αναισθησίας και ανάνηψης

Στο Σχήμα 3.1 φαίνονται οι χρόνοι παραμονής σε αναισθησία, ενώ στο Σχήμα 3.2 φαίνονται οι χρόνοι παραμονής σε ανάνηψη ανά στάδιο και για τις τέσσερις αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 3.1: Μέσος χρόνος των σταδίων αναισθησίας για κάθε αναισθητική ουσία



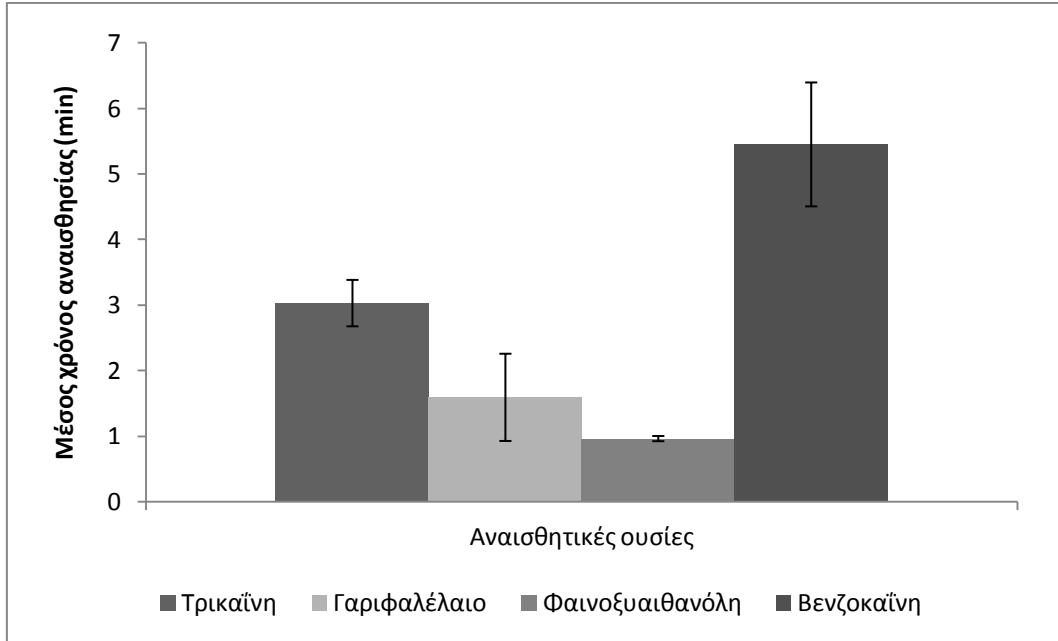
Σχήμα 3.2: Μέσος χρόνος των σταδίων ανάνηψης για κάθε αναισθητική ουσία

Από το Σχήμα 3.1 προκύπτει ότι όλες οι αναισθητικές ουσίες απαιτούν περίπου τον ίδιο χρόνο μέχρι να φτάσει το ψάρι στο πρώτο και στο δεύτερο στάδιο αναισθησίας. Οι χρόνοι όμως που απαιτούνται μέχρι τα ψάρια να φτάσουν στα επόμενα στάδια αναισθησίας παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις, πλην του γαριφαλέλαιου και της φαινοξυαιθανόλης. Το προφίλ αναισθησίας του γαριφαλέλαιου και της φαινοξυαιθανόλης είναι παρόμοιο, με μικρή διαφορά στο τελευταίο στάδιο. Επίσης, η βενζοκαΐνη έχει το μεγαλύτερο χρόνο αναισθησίας στην τσιπούρα, ενώ ακολουθούν η τρικαΐνη, το γαριφαλέλαιο και η φαινοξυαιθανόλη.

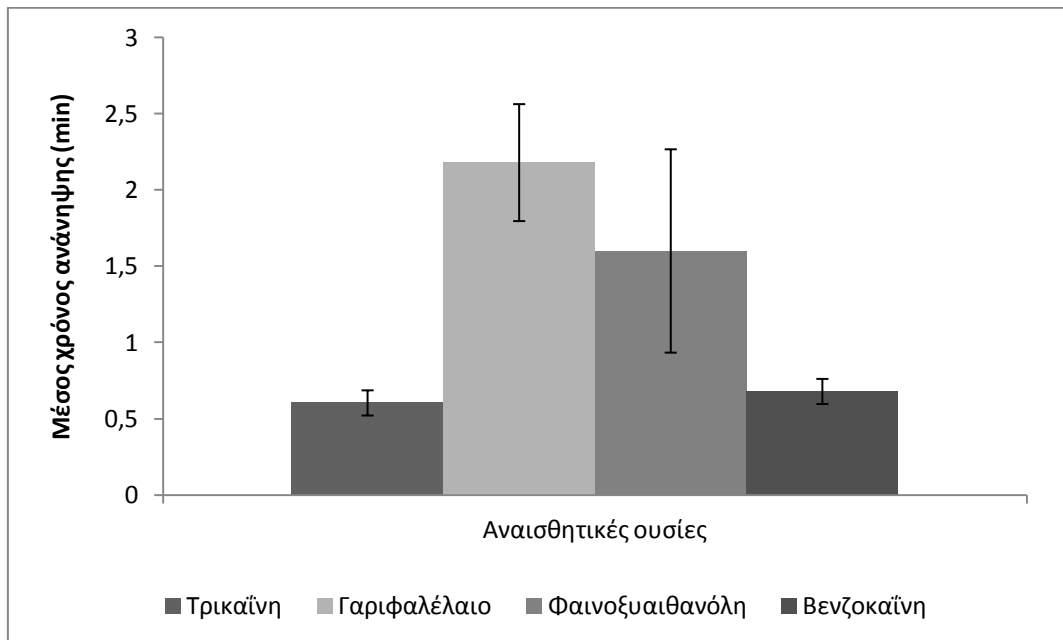
Από το Σχήμα 3.2 προκύπτει ότι σε όλες τις αναισθητικές ουσίες, εκτός από τη φαινοξυαιθανόλη, τα ψάρια εισέρχονται στο πρώτο στάδιο ανάνηψης μέσα σε ~7 sec. Το προφίλ ανάνηψης της τρικαΐνης και της βενζοκαΐνης είναι παρόμοιο. Το γαριφαλέλαιο έχει το μεγαλύτερο χρόνο ανάνηψης στην τσιπούρα, ενώ ακολουθούν η φαινοξυαιθανόλη, η βενζοκαΐνη και η τρικαΐνη.

3.2 Χρόνοι αναισθησίας και ανάνηψης

Στο Σχήμα 3.3 φαίνονται οι μέσοι χρόνοι αναισθησίας (min) για κάθε αναισθητική ουσία που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Τα αποτελέσματα του μέσου χρόνου ανάνηψης για κάθε αναισθητική ουσία συνοψίζονται στο Σχήμα 3.4.



Σχήμα 3.3: Μέσος χρόνος αναισθησίας για κάθε αναισθητική ουσία. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm).



Σχήμα 3.4: Μέσος χρόνος ανάνηψης για κάθε αναισθητική ουσία. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (\pm).

Στο Σχήμα 3.3 φαίνεται η βενζοκαΐνη να έχει το μεγαλύτερο χρόνο αναισθησίας σε σχέση με τα υπόλοιπα αναισθητικά. Ο μέσος χρόνος αναισθησίας της τρικαΐνης βρέθηκε ~ 3 min στην τσιπούρα. Τα αναισθητικά με τους μικρότερους χρόνους αναισθησίας στην τσιπούρα αποδείχτηκαν το γαριφαλέλαιο και η φαινοξυαιθανόλη, με μέσους χρόνους αναισθησίας $\sim 1,5$ min και ~ 1 min αντίστοιχα.

Οι μικρότεροι χρόνοι ανάνηψης (Σχ. 3.4) βρέθηκαν στην τρικαΐνη και στη βενζοκαΐνη, ενώ ακολουθούν η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο. Προκύπτει ότι οι απαιτούμενοι χρόνοι για την αναισθησία είναι αντιστρόφως ανάλογοι με τους αντίστοιχους της ανάνηψης.

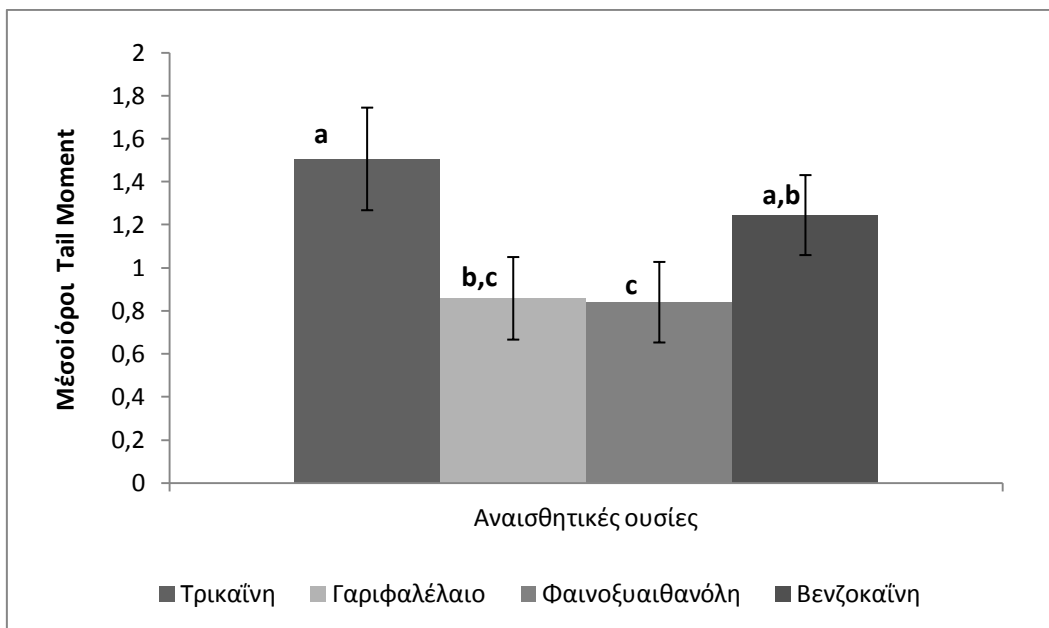
3.3 Tail Moment (TM)

Στον Πίνακα 3.1 συνοψίζεται ο αριθμός των κυττάρων που αναλύθηκαν από το αίμα και το ήπαρ της κάθε τσιπούρας, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι των TM που μετρήθηκαν για κάθε τσιπούρα ξεχωριστά.

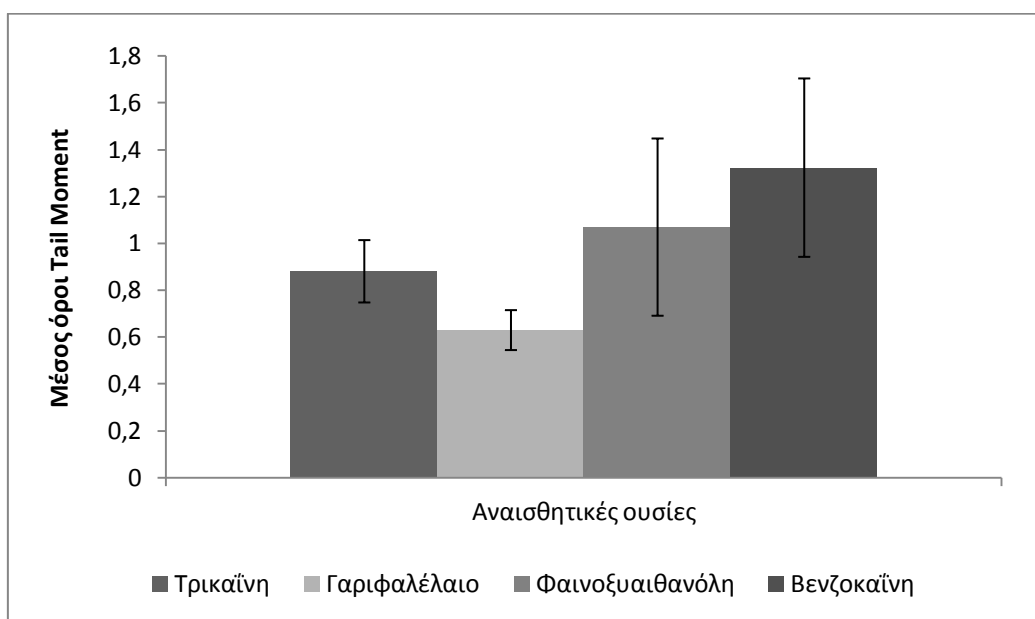
Πίνακας 3.1: Μέσοι όροι TM σε ερυθροκύτταρα και ηπατοκύτταρα τσιπούρας. Οι συμβολισμοί A,B,Γ,Δ αναφέρονται στις τέσσερις μεταχειρίσεις (A→ Τρικαΐνη, B→ Γαριφαλέλαιο, Γ→ Φαινοξυαιθανόλη, Δ→ Βενζοκαΐνη)

Άτομα τσιπούρας (N)	Αριθμός Ερυθροκυττάρων	Μέσοι όροι TM	Αριθμός Ηπατοκυττάρων	Μέσοι όροι TM
1 (A)	37	1,198692082	46	0,355322722
2 (B)	51	1,141920382	78	1,350639537
3 (Γ)	100	0,564299873	84	0,48330279
4 (Δ)	64	2,102824831	32	0,520333337
5 (A)	100	2,696521372	100	1,02103618
6 (B)	100	0,676678327	100	0,427741945
7 (Γ)	100	1,673916843	61	3,190579518
8 (Δ)	100	2,267559248	94	2,91510372
9 (A)	94	1,569351213	100	0,967872089
10 (B)	100	0,870056945	100	0,322172829
11 (Γ)	100	0,201156661	-	-
12 (Δ)	100	0,393139133	100	1,015479093
13 (A)	100	0,372973438	100	0,891831337
14 (B)	100	0,886694734	100	0,572609261
15 (Γ)	100	0,92550416	100	0,265315894
16 (Δ)	100	0,529092053	100	0,388645992
Σύνολο	1446		1295	

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παράμετρος TM χρησιμοποιείται πιο συχνά στην τεχνική της comet για την εκτίμηση της βλάβης του DNA. Στο Σχήμα 3.5 και στο Σχήμα 3.6 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι TM που μετρήθηκαν από τα ερυθροκύτταρα και από τα ηπατοκύτταρα των ατόμων τσιπούρας μετά από έκθεση σε τέσσερις διαφορετικές αναισθητικές ουσίες.



Σχήμα 3.5: Μέσοι όροι και τυπικό σφάλμα TM των ερυθροκυττάρων μετά από έκθεση σε τέσσερις αναισθητικές ουσίες. Διαφορετικοί εκθέτες (a,b,c) αναφέρονται σε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).



Σχήμα 3.6: Μέσοι όροι και τυπικό σφάλμα TM των ηπατοκυττάρων μετά από έκθεση σε τέσσερις αναισθητικές ουσίες.

Στα ερυθροκύτταρα από κάθε δείγμα τσιπούρας, φαίνεται η τιμή TM από την τρικάϊνη να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με την αντίστοιχη του γαριφαλέλαιου και της φαινοξυαιθανόλης ($P < 0,05$). Επίσης, και η τιμή TM της βενζοκαΐνης φαίνεται να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με την αντίστοιχη της φαινοξυαιθανόλης ($P < 0,05$).

Στα ηπατοκύτταρα από κάθε δείγμα τσιπούρας, φαίνεται η τιμή TM που προκάλεσαν όλα τα αναισθητικά να μη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

4. Συζήτηση

Η εκτροφή των ψαριών απαιτεί μεγάλο αριθμό διαχειριστικών παρεμβάσεων οι οποίες προκειμένου να εκτελεστούν με ευκολία και ασφάλεια, καθιστούν αναγκαία τη χρήση των αναισθητικών ουσιών. Η αναισθησία στοχεύει κυρίως στον περιορισμό της κινητικότητας των ψαριών. Το ιδανικό αναισθητικό για τα ψάρια πρέπει να εξασφαλίζει γρήγορη νάρκωση (<3 min) και ανάνηψη (<5 min) από την αναισθησία, να είναι ασφαλές για τα ψάρια και τον άνθρωπο, να έχει υψηλή διαλυτότητα στο γλυκό και στο θαλασσινό νερό, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς και να είναι οικονομικό και εύχρηστο (Marking and Meyer, 1985). Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας των ιχθύων μπορούν να διακριθούν διάφορα επίπεδα ή στάδια.

4.1 Επίδραση αναισθητικών ουσιών στην αναισθησία και ανάνηψη των ψαριών

Από την παρούσα έρευνα προέκυψε ότι ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσουν τα ψάρια στο πρώτο και στο δεύτερο στάδιο αναισθησίας δεν εξαρτάται από το είδος του αναισθητικού. Ωστόσο, οι χρόνοι που απαιτούνται μέχρι τα ψάρια να φτάσουν στα επόμενα στάδια αναισθησίας παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις, πλην του γαριφαλέλαιου και της φαινοξυαιθανόλης. Το προφίλ αναισθησίας του γαριφαλέλαιου και της φαινοξυαιθανόλης είναι σχεδόν παρόμοιο, με μικρή διαφορά στο τελευταίο στάδιο.

Στη παρούσα έρευνα, η βενζοκαΐνη φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερο χρόνο αναισθησίας σε σχέση με τα υπόλοιπα αναισθητικά, γεγονός που ωστόσο δεν έχει διαπιστωθεί από τους Munday and Wilson (1997) στο είδος *Pomacentrus amboinensis* (Bleeker, 1868). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στα διαφορετικά είδη και στα μεγέθη των ψαριών. Ένα από τα κριτήρια που πρέπει να πληρεί ένα αναισθητικό

για να θεωρείται ιδανικό για χρήση στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια, είναι η σύντομη διάρκεια αναισθησίας (<3 min) (Marking and Meyer, 1985). Το γεγονός αυτό καθιστά τη βενζοκαΐνη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, ακατάλληλο αναισθητικό για χρήση στην εκτροφή των ευρύαλων ψαριών.

Ο μέσος χρόνος αναισθησίας της τρικαΐνης βρέθηκε ~3 min στην τσιπούρα, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Hseu *et al.* (1998) στο *Sparus sarba* (Forsskål, 1775), στο οποίο ο χρόνος αναισθησίας ήταν $3,84 \pm 0,2$ min με παρόμοια δόση αναισθητικού. Οι Weber *et al.* (2009) διαπίστωσαν παρόμοιους χρόνους (75 mg/l, $2,42 \pm 0,2$ min) αναισθησίας στη γλώσσα (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) με την τρικαΐνη. Αναφέρεται όμως και η περίπτωση ότι η έκθεση του *S. sarba* για >15 min στην τρικαΐνη σε μικρότερη συγκέντρωση (50 mg/l) είναι θανατηφόρα (Hseu *et al.*, 1998).

Τα αναισθητικά με τους μικρότερους χρόνους αναισθησίας στην τσιπούρα αποδείχτηκαν το γαριφαλέλαιο (50 mg/l) και η φαινοξυαιθανόλη (500 mg/l) με μέσους χρόνους αναισθησίας ~1,5 min και ~1 min αντίστοιχα, γεγονός που έχει διαπιστωθεί και από τους Mylonas *et al.* (2005) στην τσιπούρα και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758). Τα δύο αναισθητικά δεν έχουν μεγάλη διαφορά στους χρόνους αναισθησίας μεταξύ τους, ωστόσο η συγκέντρωση του γαριφαλέλαιου είναι δέκα φορές μικρότερη από εκείνη της φαινοξυαιθανόλης. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τα πλεονεκτήματα που μπορεί να έχει το γαριφαλέλαιο ως αναισθητικό στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια λόγω υψηλής αποδοτικότητας έναντι άλλων χημικών ουσιών, η οποία μεταφράζεται ως μικρότερο κόστος για αναισθητικές ουσίες και μικρότερη επίδραση στο περιβάλλον.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γαριφαλέλαιο έχει μικρότερο χρόνο αναισθησίας από τη βενζοκαΐνη και την τρικαΐνη, αλλά λίγο μεγαλύτερη από τη φαινοξυαιθανόλη στην τσιπούρα. Σύμφωνα με τους Roubach *et al.* (2005) στα νεαρά άτομα του *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) η ολική απώλεια ισορροπίας επέρχεται σε ~2 min με συγκέντρωση γαριφαλέλαιου 50 mg/l και όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναισθητικού μειώνεται ο χρόνος αναισθησίας του. Τα νεαρά άτομα του *Centropristis striata* (Linnaeus, 1758) χρειάζονται μικρότερη συγκέντρωση του γαριφαλέλαιου (20 mg/l) για να φτάσουν στο τελικό στάδιο αναισθησίας μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα (King *et al.*, 2005). Τα νεαρά άτομα του *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792) αναισθητοποιούνται μέσα σε 2 min με 20 μl/l γαριφαλέλαιο (Cho and Heath, 2000). Ωστόσο οι Keene *et al.* (1998) διαπίστωσαν στα νεαρά άτομα της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) ότι οι συγκεντρώσεις γαριφαλέλαιου >60 mg/l προκαλούν αναισθησία σε 1,5-2,5 min. Όπως προκύπτει και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία το γαριφαλέλαιο έχει μικρό χρόνο αναισθησίας ανεξάρτητα από το είδος και μέγεθος ψαριού και αυτό πιθανώς να οφείλεται στην υψηλή δραστηριότητα της ευγενόλης, η οποία αποτελεί το κυριότερο συστατικό του γαριφαλέλαιου (Keene *et al.*, 1998).

Στην παρούσα έρευνα, η φαινοξυαιθανόλη φαίνεται να έχει τον μικρότερο χρόνο αναισθησίας στην τσιπούρα σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα αναισθητικά που εξετάστηκαν, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους Weber *et al.* (2009) στη γλώσσα (*S. senegalensis*), οι οποίοι αναφέρουν ότι η ελάχιστη δραστική συγκέντρωση φαινοξυαιθανόλης για να προκληθεί αναισθησία <3 min είναι 600 mg/l. Στον σαργό (*Diplodus sargus* Linnaeus, 1758) και στο μυτάκι (*Diplodus puntazzo* Walbaum, 1792), οι συγκεντρώσεις φαινοξυαιθανόλης 0,2, 0,3 και 0,4 ml/l προκαλούν αναισθησία <3

min, όμως ταυτόχρονα μεγαλώνει ο χρόνος ανάνηψης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναισθητικού (Tsantilas *et al.*, 2006). Αυτό καταδεικνύει ότι η φαινοξυαιθανόλη έχει μικρό χρόνο αναισθησίας, ωστόσο η δραστική της συγκέντρωση, δηλ. η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για να αναισθητοποιηθεί το ψάρι, είναι αρκετά μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αναισθητικών.

Τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με την τρικαΐνη, τη βενζοκαΐνη και το γαριφαλέλαιο αμέσως μετά τη μεταφορά τους σε νερό απαλλαγμένο από την αναισθητική ουσία εισήλθαν στο πρώτο στάδιο ανάνηψης. Οι μικρότεροι χρόνοι ανάνηψης βρέθηκαν στην τρικαΐνη και στη βενζοκαΐνη, ενώ ακολουθούν η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο. Προκύπτει ότι οι απαιτούμενοι χρόνοι για την αναισθησία είναι αντιστρόφως ανάλογοι με τους αντίστοιχους της ανάνηψης.

Το προφίλ ανάνηψης της τρικαΐνης και της βενζοκαΐνης σε όλα τα στάδια αποδείχτηκε παρόμοιο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον τρόπο μεταβολισμού των δύο αναισθητικών, διότι χημικά μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους (Ross and Ross, 2008).

Η ανάνηψη της τσιπούρας από την αναισθησία με τη φαινοξυαιθανόλη γίνεται σε ~1,5 min ενώ με το γαριφαλέλαιο σε >2 min. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο χρόνος έκθεσης στη φαινοξυαιθανόλη είναι μικρότερος σε σχέση με το γαριφαλέλαιο. Είναι γνωστό ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις αναισθητικού προκαλούν ταχύτερη αναισθησία, κατά συνέπεια το ψάρι απομακρύνεται νωρίτερα από το λουτρό με το αναισθητικό για επαναφορά, σε σχέση με τα ψάρια που εκτίθενται σε αναισθητικά με μικρότερες συγκεντρώσεις. Και τα δύο αναισθητικά αυτά είναι ιδιαίτερα λιπόφιλα, επομένως απορροφώνται από τους ιστούς του σώματος όπως το λίπος και ο εγκέφαλος (Mylonas *et al.*, 2005). Όσο πιο σύντομος είναι ο χρόνος έκθεσης στο λουτρό αναισθητικού, τόσο μικρότερο το ποσό αναισθητικού που

απορροφάται από το σώμα. Κατά συνέπεια, η απομάκρυνση του αναισθητικού από το σώμα του ψαριού γίνεται ταχύτερα και επομένως η ανάνηψη από την αναισθησία είναι συντομότερη.

4.2 Ανίχνευση βλάβης του DNA μετά την αναισθησία

Οι γενοτοξικές ενώσεις προκαλούν χημικές ή φυσικές τροποποιήσεις στο DNA. Η έκθεση των υδρόβιων οργανισμών σε γενοτοξικές ενώσεις μπορούν να έχουν αποτελέσματα όπως ο καρκίνος, τερατογενέσεις και εμβρυοτοξικότητα (Nacci *et al.*, 1996). Στην παρούσα έρευνα έγινε προσπάθεια εκτίμησης της καταπόνησης και της πιθανής γενοτοξικής δράσης των αναισθητικών στην τσιπούρα με την τεχνική της comet, η οποία αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο για την ανίχνευση της βλάβης του DNA (Weerd *et al.*, 1998).

Τα ερυθροκύτταρα και ηπατοκύτταρα από κάθε δείγμα τσιπούρας αναλύθηκαν με την τεχνική της comet. Μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικοί τύποι κυττάρων αποκρίνονται με διαφορετική ευαισθησία στην έκθεση σε μολυσματικούς παράγοντες (Kim and Hyun, 2006).

Στα ψάρια, το 97% των συνολικών αιμοκυττάρων αποτελείται από τα ερυθροκύτταρα (Theodorakis *et al.*, 1994). Τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις τοξικολογικές μελέτες διότι η λήψη τους είναι σχετικά εύκολη. Η παρουσία του πυρήνα στα ερυθροκύτταρα των ψαριών επιτρέπει τη χρήση τους στην εκτίμηση της βλάβης του DNA (Moretti *et al.*, 1998).

Από την άλλη το ήπαρ, είναι το κυριότερο όργανο για το μεταβολισμό των απορροφημένων ενώσεων (Hartmann and Speit, 2009). Όμως οι συμπαγείς ιστοί, όπως

το ήπαρ, απαιτούν διαχωρισμό πριν την ανάλυση, με την πιθανότητα εισαγωγής βλάβης μέσω ενζυματικών ή μηχανικών διαδικασιών (Frenzilli *et al.*, 2009).

Στα ερυθροκύτταρα από κάθε δείγμα τσιπούρας, φάνηκε η τρικαΐνη να έχει προκαλέσει το μεγαλύτερο TM, ενώ ακολουθεί η βενζοκαΐνη. Το γαριφαλέλαιο και η φαινοξυαιθανόλη δεν παρουσίασαν μεγάλη διαφορά στα TM.

Στα ηπατοκύτταρα, φάνηκε η βενζοκαΐνη να έχει προκαλέσει το μεγαλύτερο TM και ακολουθούν η φαινοξυαιθανόλη, η τρικαΐνη και το γαριφαλέλαιο, χωρίς ωστόσο αυτές οι διαφορές να επιβεβαιώνονται στατιστικά.

Η παράμετρος TM που μετρήθηκε σε κάθε δείγμα δεν έδειξε αξιοσημείωτη βλάβη στο DNA της τσιπούρας. Ωστόσο, διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στις μεταχειρίσεις. Τα αναισθητικά με μεγάλους χρόνους αναισθησίας έδειξαν μεγαλύτερο TM, χωρίς όμως να παρατηρούνται μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο χρόνο αναισθησίας. Το ψάρι στρεσάρεται περισσότερο, επειδή αργεί να φτάσει στον τελικό στάδιο της αναισθησίας, όπου δεν αντιλαμβάνεται τα εξωτερικά ερεθίσματα από το περιβάλλον.

Η φαινοξυαιθανόλη παρόλο που προκαλεί γρήγορη αναισθησία, στην παρούσα έρευνα φάνηκε να προκαλεί σχετικά υψηλές τιμές TM, όπως προέκυψε από την ανάλυση των ηπατικών κυττάρων της τσιπούρας, γεγονός όμως που δεν εντοπίστηκε στα ερυθροκύτταρα των ίδιων δειγμάτων. Σύμφωνα με τους Summerfelt and Smith (1990), βασισμένα σε στοιχεία ανθρώπινης τοξικολογίας, η φαινοξυαιθανόλη μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο ήπαρ ή στους νεφρούς. Το γεγονός αυτό, μπορεί να εξηγήσει τη δράση της φαινοξυαιθανόλης στα ηπατικά κύτταρα της τσιπούρας.

Για τη βενζοκαΐνη, παρόμοιο αποτέλεσμα με την παρούσα έρευνα διαπιστώθηκε από τους de Miranda Cabral Gontijo *et al.* (2003), σε πειράματα *in vitro* (80-600 mg/l)

και in vivo (80 mg/l) στα ερυθροκύτταρα του ενήλικου *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759). Μη γενετοξική δράση της τρικαΐνης στα ερυθροκύτταρα του *O. niloticus* διαπιστώθηκε από τους Barreto *et al.* (2007), σε πειράματα in vivo και in vitro.

Τα ανάλογα της προκαΐνης (αλκαλοειδή), τα οποία μοιάζουν αρκετά στη δομή με τη βενζοκαΐνη και την τρικαΐνη και χρησιμοποιούνται ως τοπικά αναισθητικά στον άνθρωπο, έχουν εξεταστεί για πιθανή γενετοξικότητα και μεταλλαξιγένεση (mutagenicity) σε διαφορετικούς οργανισμούς, όπως τα βακτήρια, το *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) και τα θηλαστικά, χωρίς αξιοσημείωτη γενετοξική δράση (de Miranda Cabral Gontijo *et al.*, 2003; Barreto *et al.*, 2007). Κατά συνέπεια, η ομάδα αυτών των ενώσεων φαίνεται να μη προκαλεί γενετοξικότητα.

Η ευγενόλη, το κυριότερο συστατικό του γαριφαλέλαιου (70-90% του βάρους) έχει αναφερθεί ότι είναι τοξική για το ήπαρ, που σημαίνει ότι μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη λειτουργία του ήπατος (Thompson *et al.*, 1998; Fujisawa *et al.*, 2002). Αντιθέτως, οι Wagner *et al.* (2002) αναφέρουν ότι η ευγενόλη μεταβολίζεται και αποβάλλεται γρήγορα από τους ιστούς των ψαριών. Επίσης, η παρουσία της στο μυϊκό ιστό των ψαριών ή άλλων ζώων δεν είναι τοξική ή δεν προκαλεί μεταλλάξεις (Maura *et al.*, 1989; Phillips, 1990).

4.3 Συμπεράσματα

Από την παρούσα έρευνα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Οι απαιτούμενοι χρόνοι για την αναισθησία είναι αντιστρόφως ανάλογοι με τους αντίστοιχους χρόνους της ανάνηψης.
- Στην παρούσα έρευνα δεν ανιχνεύθηκε γενετοξικότητα με την τεχνική της comet στα ερυθροκύτταρα και στα ηπατοκύτταρα της τσιπούρας από την έκθεση σε

αναισθητικές ουσίες στις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν. Άρα, αυτά τα αναισθητικά δεν προσθέτουν επιπλέον καταπόνηση και είναι ασφαλή για τα ψάρια.

- Η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν πολύ μικρή. Ωστόσο, τα αναισθητικά με μεγάλους χρόνους αναισθησίας έδειξαν μεγαλύτερη βλάβη DNA. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο χρόνο αναισθησίας, διότι το ψάρι στρεσάρεται περισσότερο επειδή καθυστερεί η αναισθητοποίησή του.
- Λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια όπως γρήγορη αναισθησία και ανάνηψη, γενотоξικότητα και κόστος, τα αναισθητικά που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα κατατάσσονται από το περισσότερο έως το λιγότερο ιδανικό ως εξής: γαριφαλέλαιο, φαινοξυαιθανόλη, τρικαΐνη και βενζοκαΐνη.

5. Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

- ❖ Barreto R.E., de Miranda Cabral Gontijo M.C., Alves de Lima R.O., Raymundi V.C., Pinhal D., Reyes V.A.V., Volpato G.L. and Salvadori D.M.F. (2007). MS222 does not induce primary DNA damage in fish. *Aquaculture International* 15:163–168.
- ❖ Barton B.A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42:517-525.
- ❖ Barton B.A. and Iwama G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual review of fish diseases*: 3-26.
- ❖ Barton B.A. and Peter R.E. (1982). Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anesthesia, and cold shock. *Journal of Fish Biology* 20: 39-51.
- ❖ Basu N., Nakano T, Grau E.G, and Iwama G.K. (2001). The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species. *General and Comparative Endocrinology* 124: 97-105.
- ❖ Boyd C.E. (2003). Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture* 226: 101-112.
- ❖ Bressler K. and Ron B. (2004). Effect of anesthetics on the stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture* 56(1): 5-13.

- ❖ Cho G.K. and Heath D.D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 31: 537-546.
- ❖ Collins A.R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249-261.
- ❖ Cuesta A., Angeles Esteban M. and Meseguer J. (2003). Effects of different stressor agents on gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 433-441.
- ❖ de Miranda Cabral Gontijo A.M., Barreto R.E., Speit G., Reyes V.A.V., Volpato G.L. and Salvadori D.M.F. (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research* 534: 165-172.
- ❖ Deriggi G.F., Inoue L.A.K.A. and Moraes G. (2006). Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Maringá* 28(3): 269-274.
- ❖ Dhawan A., Bajpayee M. and Parmar D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 25: 5-32.
- ❖ Fairbairn D.W., Olive P.L. and O'Neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59.
- ❖ FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. 2000.

- ❖ Frenzilli G., Nigro M. and Lyons B.P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681: 80-92.
- ❖ Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. and Sakagami H. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177(1): 39-54.
- ❖ Hartmann A. and Speit G. (2009). Comet Assay - Protocols and Testing Strategies. In: *The Comet Assay in Toxicology* (eds Dhawan A. & Anderson D.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, σελ. 377-378.
- ❖ Hseu J.R., Yeh S.L., Chu Y.T. and Ting Y.Y. (1998). Comparison of Efficacy of Five Anesthetics in Goldlined Sea Bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica* 9(1): 35-41.
- ❖ Iwama G.K., Afonso L.O.B. and Vijayan M.M. (2004). Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare, Campbell River, B.C. Canada.
- ❖ Keene J.L., Noakes D.L.G., Moccia R.D. and Soto C.G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29: 89-101.
- ❖ Kim I.Y. and Hyun C. K. (2006). Comparative evaluation of the alkaline Comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 288-297.
- ❖ King W.V., Hooper B., Hillsgrave S., Benton C, and Berlinsky D. L. (2005). The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research* 36: 1442-1449.

- ❖ Marking L.L. and Meyer F.P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries 10*: 2-5.
- ❖ Maura A., Pino A. and Ricci R. (1989). Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. *Mutation Research 227*: 125-129.
- ❖ Moretti M., Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Santroni A.M., Fedeli D. and Falcioni G. (1998). Extent of DNA damage in density-separated trout erythrocytes assessed by the 'comet' assay. *Mutation Research 397*: 353-360.
- ❖ Munday P.L. and Wilson S.K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology 51*: 931-938.
- ❖ Mylonas C.C., Cardinaletti G., Sigelaki I. and Polzonetti - Magni A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture 246*: 467-481.
- ❖ Nacci D.E., Cayula S. & Jackim E. (1996). Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology 35*: 197-210.
- ❖ Ortuno J., Esteban M.A. and Meseguer J. (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology 12*: 49-59.
- ❖ Phillips D.H. (1990). Further evidence that eugenol does not bind to DNA in vivo. *Mutation Research 243*: 23-26.

- ❖ Porchas M.M., Cordova L.R.M. and Enriquez R.R. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2): 158-178.
- ❖ Read P. and Fernandes T. (2003). Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture* 226: 139-163.
- ❖ Ross L.G. and Ross B. (2008). Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals - 3rd Edition. Blackwell Publishing Ltd., σελ. 7, 79-81, 83-84.
- ❖ Roubach R., Gomes L.C., Fonseca F.A.L. and Val A.L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research* 36: 1056-1061.
- ❖ Summerfelt R.C. & Smith L.S. (1990). Anaesthesia, surgery and related techniques. In: *Methods for Fish Biology* (eds Schreck C.B. & Moyle P.B.). Bethesda MD: American Fisheries Society, σελ. 213-272.
- ❖ Theodorakis C.W., D'Surney S.J. and Shugart L.R. (1994). Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental Toxicology & Chemistry* 13: 1023-1031.
- ❖ Thompson D.C., Barhoumi R. and Burghardt R.C. (1998). Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 149(1): 55-63.
- ❖ Tsantilas H., Galatos A.D., Athanassopoulou F., Prassinis N.N. and Kousoulaki K. (2006). Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture* 253: 64-70.

- ❖ Vijayan M.M. and Moon T.W. (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Canadian journal of zoology* 72: 379-386.
- ❖ Wagner E., Arndt R. and Hilton B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211: 353-366.
- ❖ Weber R.A., Peleteiro J.B., Garcia Martin L.O. and Aldegunde M. (2009). The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* 288: 147-150.
- ❖ Weerd J.H. & Van Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: A critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120: 107-112.
- ❖ Zahl I.H., Kiessling A., Samuelsen O.B. and Olsen R.E., (2009). Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology & Biochemistry* DOI 10.1007/s10695-009-9346-2.
- ❖ Zar J.H. (1984). *Biostatistical Analysis* - 2nd Edition. Practice Hall, Englewood Clifs, New Jersey, σελ. 241.

Ελληνική βιβλιογραφία

- ❖ Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1998). *Ενδοκρινολογία Ιχθύων*. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 179, 517-518.
- ❖ Τσαντήλας Η., Γαλάτος Α.Δ. και Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. *Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας* 56 (2): 130-137.

6. Abstract

Stress in fish has been defined as a state which threatens survival and reflects living conditions. In the aquaculture industry, stress situations arise daily, and affect fish production, quality, reproduction and disease resistance. Netting, handling, transport, crowding, social interactions are common stressors which lead to fish immunodepression, reduced growth rate, physical injury or death. Anesthetics are widely used in routine aquaculture operations to immobilize animals. An ideal anesthetic must ensure: short induction and recovery time, non-toxicity to fish and humans, rapid removal from the body, high solubility in fresh and salt water, availability and cost effectiveness. The aim of this study is to investigate the stages of anesthesia and recovery by using different anesthetics and to estimate the possibly induced stress and genotoxic effect of these substances on erythrocytes and hepatocytes of gilthead seabream.

In the present study, 32 gilthead seabreams were anesthetized with four different anesthetics (MS222, clove oil, 2-phenoxyethanol and benzocaine) to investigate the stages of anesthesia and recovery and to record the time of each stage. Also, the comet assay, which is a reliable technique for assessing DNA damage in cells, was used to estimate the possibly genotoxic effects of these anesthetics on erythrocytes and hepatocytes of gilthead seabream.

Benzocaine seemed to have longer mean induction time compared to other anesthetics while the mean induction time of MS222 was ~ 3 min. The anesthetics with shorter induction times were clove oil and 2-phenoxyethanol with mean induction times ~1,5 min and ~1 min, respectively. According to the references, clove oil has short induction time, regardless of species and size of the fish and probably this is due to the

high efficacy of eugenol, which is the main ingredient of clove oil. 2-phenoxyethanol, which is the most widely used anesthetic in the intensive aquaculture of euryhaline fish, appears to have shorter induction time in gilthead seabream than all the other tested anesthetics, in other species such as senegalese sole, white seabream and sharpsnout seabream. However, the minimum concentration required to anesthetize the fish is higher than the concentrations of other anesthetics.

The shorter recovery time was found in MS222 and benzocaine, followed by 2-phenoxyethanol and clove oil. In conclusion, the induction time for anesthesia is reversely proportional to the recovery time.

As it may concern the possible genotoxic effect of anesthetics which was studied using the comet assay, none of the anesthetics caused significant DNA damage in gilthead seabream. However, differences were observed between the anesthetics.

In this study Tail Moment (TM) parameter was used, to estimate the DNA damage. Anesthetics with long induction time showed higher TM without extreme differences between them. This may be due to the induction time of the anesthetics. Fish is stressed more, because they reach the final stage of anesthesia later when they don't perceive external stimuli. Low values of TM, near to 0, were observed in all the samples. This indicates that the fish DNA has not been high damaged from the exposure to various anesthetics at the concentrations which were used. Thus, these anesthetics are safe for use in the intensive aquaculture of gilthead seabream, because they are not causing additional stress.

Keywords: Stress, anesthetics, comet assay, DNA damage.