

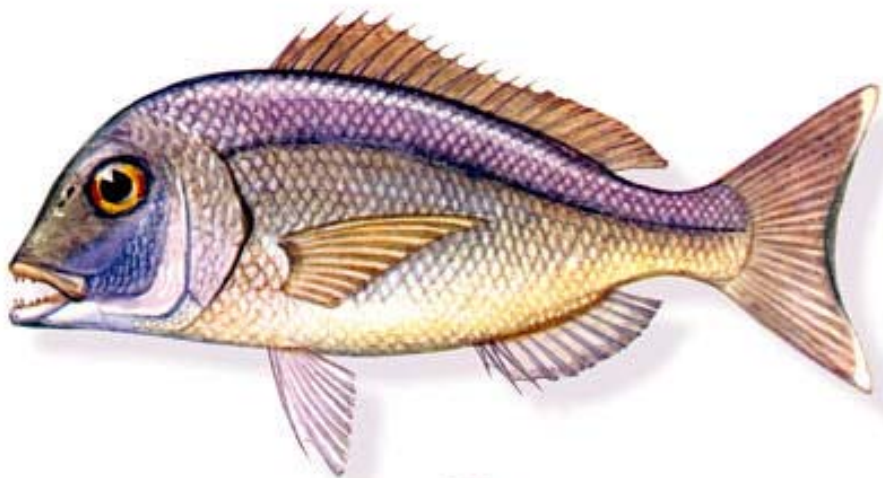


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

Μεταπτυχιακή διατριβή

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΟ ΦΑΓΚΡΙ.



Pagrus pagrus

Φανουράκη Ελευθερία
Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2005

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στις

εγκαταστάσεις του

Πανεπιστημίου Κρήτης, 

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων

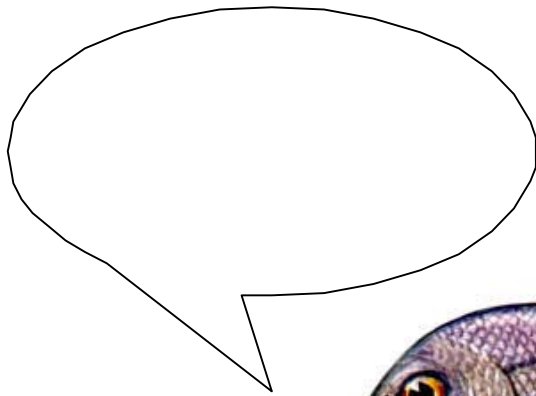
και του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε 

Τμήμα Υδατοκαλλιεργειών

Επιβλέπων καθηγητής: Λέκτορας Παυλίδης Μιχάλης

2^{ος} Εξεταστής: Καθηγήτρια Δερμών Αικατερίνη

. . . στην οικογένεια μου



Pagrus pagrus

(Fanourakis N. Personal communication)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα πριν ξεκινήσω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέπων καθηγητή κ. Παυλίδη Μιχάλη για την καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια, για τον πολύτιμο χρόνο που έχει αφιερώσει, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές.

Επίσης ευχαριστώ την κ. Δερμών, που δέχτηκε να με βοηθήσει σε αυτήν μου την προσπάθεια, για τις πολύτιμες συμβουλές και την προθυμία να μου διαθέσει τον εξοπλισμό του εργαστηρίου της. Ήταν ευχάριστη συνεργασία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Λάμπρο, για την βοήθεια του στον προσδιορισμό της ποσότητας μελανίνης στο δέρμα.

Ευχαριστώ τον κ. Pascal Divanach, για την παραχώρηση των εγκαταστάσεων του Τμήματος Ιχθυοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., όπου πραγματοποιήθηκε μέρος της διατριβής μου. Από το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην κ. Κοκκάρη Κωνσταντίνα, την ψυχή του εργαστηρίου. Ευχαριστώ πολύ Ντίντα μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παπαανδρουλάκη, τον Παντελή (γιατρέ μου...), τον Σταύρο και τον Κώστα.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να παραλείψω τον κ. Πυρίντζο, για τον χρόνο που διέθεσε και τις πολύτιμες συμβουλές του και τον Μιχάλη, από το εργαστήριο οικολογίας και συστηματικής φυτών, για την βοήθεια και την ευχάριστη παρέα. Βερουλίνι (Αφεντικό) ευχαριστώ για όλα.....αλλά δεν το ξεχνώ (μου χρωστάς 55 Guppies), Γρηγόρη (σ' ευχαριστώ για το ωραιότερο ενυδρείο του πλανήτη και κυρίως γιατί το έκανες στο σπίτι μου), Μαρία, Ποπάρα, Γιώργο (ελπίζω να αντέχεις το κρύο και να περνάς καλά), ευχαριστώ που υπάρχουνε. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, ο καθένας θα ήταν ευτυχισμένος.

Γιωργία (θα τα πούμε στην Κύπρο, να περνάς πάντα καλά, μου λείπεις πολύ), Μαρίνα (μαζί στον αγώνα), Κωνσταντίνα, χάρηκα πολύ που σας γνώρισα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, για την αμέριστη συμπαράσταση που δείχνει σε όλες μου τις αποφάσεις. Είστε τα πάντα για μένα.

Περιεχόμενα

Abstract	1
Περίληψη	2
Εισαγωγή	6
Υδατοκαλλιέργειες και Ευεξία ζώων	6
Η έννοια της καταπόνησης	8
Πηγές καταπόνησης στην εντατική υδατοκαλλιέργεια	9
Απόκριση στην καταπόνηση	19
Σκοπός	40
Υλικά και Μέθοδοι	42
Ψάρια και πειραματικές συνθήκες	42
Δειγματοληψία	43
Σχεδιασμός πειραμάτων	44
1.1. Ανάπτυξη και αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης ..	44
1.2. Αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού των κατεχολαμινών	44
Αξιολόγηση χρήσης αναισθησίας	44
2.1. Ηθολογική απόκριση των ψαριών στην αναισθησία	44
2.2. Φυσιολογική απόκριση των ψαριών στην αναισθησία	45
Απόκριση των ψαριών σε οξεία καταπόνηση	46
3.1. Σύλληψη και έκθεση στον αέρα (συγχρωτισμός)	46
3.2. Κινητική της απόκρισης σε οξεία καταπόνηση	47
Πυκνότητα εκτροφής και καταπόνηση	47
Θερμοκρασία εκτροφής και καταπόνηση	49
Προσδιορισμοί	49
Στατιστική ανάλυση	60
Προσδιορισμός κορτιζόλης	61
Αποτελέσματα	69
1.1. Ανάπτυξη και αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης ..	69
1.2. Αξιολόγηση μεθόδου προσδιορισμού κατεχολαμινών	71
Αξιολόγηση χρήσης αναισθησίας	73
2.1. Απόκριση ψαριών στην αναισθησία	73
2.2. Αναισθησία και δείκτες καταπόνησης	74
Απόκριση των ψαριών σε οξεία καταπόνηση	80

3.1. Σύλληψη και έκθεση στον αέρα (συγχρωτισμός)	80
3.2. Κινητική της απόκρισης σε οξεία καταπόνηση.	85
Πυκνότητα εκτροφής και καταπόνηση.	86
Θερμοκρασία εκτροφής και καταπόνηση.	94
Παράρτημα	103
Καθορισμός τιμών εκκίνησης.	104
Συζήτηση.	105
Συμπεράσματα.	122
Βιβλιογραφία.	125

**Επισυνάπτεται CD-ROM που περιέχει την
Μεταπτυχιακή διατριβή σε ηλεκτρονική μορφή.**



Abstract

The aim of the present study was to develop and evaluate reliable stress indicators in the red porgy, *Pagrus pagrus*. Specific objectives were (i) to develop a radioimmunoassay for the determination of cortisol, (ii) to evaluate a commercial assay for the determination of catecholamines (Epinephrine and Norepinephrine), (iii) to develop new indicators of acute and chronic stress (prothrombin time, skin colour and concentration of melanin in the skin), and (iv) set baseline values for all stress indicators.

The first experiment concerned the evaluation of the use of two anesthetics, 2-phenoxyethanol and clove oil. 2-phenoxyethanol was found to be the most convenient anesthetic for red porgy. The second experiment was to define the response of red porgy to acute (capture and exposure to the air for 3min) and chronic stressors (different stocking density: 5 vs. 25kg/m³; and different water temperatures: 15–19–25°C).

Cortisol and lactate were found to be reliable stress indicators of acute stress, presenting elevated concentrations for the first two hours after exposure to the stress stimuli and been declined to resting values after 24h. Catecholamines, glucose, electrolytes, and prothrombin time were also found to be reliable indicators for acute stress, whereas catecholamines, lactate, skin colour and concentration of melanin in the skin, were found to be reliable indicators for chronic stress. Skin colour also exhibited a remarkable relationship with chronic stress with skin being brighter (*L**) in non anesthetized fish and in individuals acclimated in 19°C water temperature.

Baseline values were determined as follow: Glucose, 2.01–5.21 mmole L⁻¹; Lactate, 0.09–1.95 mmol L⁻¹; Epinephrine, 0.39–5.61 ng ml⁻¹; Norepinephrine, 1.37–9.77 ng ml⁻¹; Cortisol, 0.95–22.93 ng ml⁻¹; K⁺, 2.00–4.51 mmole L⁻¹; Na⁺, 166.96–196.17 mmole L⁻¹, Osmotic pressure, 288.4–302.4 mOsm Kg⁻¹, and Prothrombin time, 6.78–17.44 sec.

The present study also revealed that density by means of kg/m³, is not an appropriate term to describe the physiological condition of fish (stress). Relative volume, *i.e.* the volume that the population of the fish occupy within the total water volume, seems to be more appropriate to describe the social interactions between individuals, and thus the stress response. In addition, water temperature (15 and 25

°C) is an important environmental stressor for *Pagrus pagrus*, as shown by the elevated of catecholamines and lactate concentrations in plasma.



Περίληψη

στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταπονημένων και μη ατόμων. Τα μη καταπονημένα ψάρια, που υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι πριν τη δειγματοληψία, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μειωμένες τιμές στα επίπεδα κατεχολαμινών και ιόντων καλίου του πλάσματος, σε σύγκριση με τα μη καταπονημένα άτομα (control). Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης και του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα, παρέμειναν υψηλές μέχρι και 2 ώρες μετά το επεισόδιο οξείας καταπόνησης (πολύ γρήγορο άδειασμα του ύδατος της δεξαμενής και έκθεση εκτός ύδατος για 1 λεπτό), ενώ επανήλθαν στις τιμές εκκίνησης μετά το πέρασ του πρώτου εικοσιτετραώρου.

Τα επίπεδα της γλυκόζης, των κατεχολαμινών, της κορτιζόλης και της οσμωτικής πίεσης, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των πυκνοτήτων εκτροφής (5–25kg/L), ενώ τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος, της ποσότητας μελανίνης στο δέρμα και των ιόντων νατρίου παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων χαμηλής (LD) και υψηλής πυκνότητας (HD) και της ομάδας χαμηλής πυκνότητας και χαμηλού διαθέσιμου όγκου (LDLV). Το χρώμα του δέρματος δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων χαμηλής (LD) και υψηλής πυκνότητας (HD), ενώ παρουσιάζει διαφορά μεταξύ αναισθητοποιημένων και μη ατόμων τα οποία είχαν φωτεινότερο χρώμα δέρματος. Οι διαφορετικές φυσιολογικές αποκρίσεις στην καταπόνηση μεταξύ των ομάδων χαμηλής (LD) και υψηλής πυκνότητας (HD) με την ομάδα χαμηλής πυκνότητας και χαμηλού διαθέσιμου όγκου (LDLV), οφείλεται στον σχετικό όγκο, που είναι ο όγκος που καταλαμβάνει ο πληθυσμός των ιχθύων στον συνολικό όγκο του ύδατος της δεξαμενής και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται.

Σε απόκριση στις διαφορετικές θερμοκρασίες ύδατος (15–19–21° C), τα επίπεδα γλυκόζης βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα T-15, ενώ του γαλακτικού οξέως βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στην ίδια ομάδα. Τα επίπεδα νορεπινεφρίνης και κορτιζόλης βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα T-25 και η νορεπινεφρίνη χαμηλότερη στην ομάδα T-19. Τα επίπεδα των ηλεκτρολυτών και του pH των μυών δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Το χρώμα του δέρματος ήταν φωτεινότερο στην ομάδα T-19

και στα μη αναισθητοποιημένα άτομα.

Τέλος οι τιμές εκκίνησης εκτιμήθηκαν ως εξής: Γλυκόζη: 2,01–5,21 mmole L⁻¹, Γαλακτικό: 0,09–1,95 mmol L⁻¹, Επινεφρίνη: 0,39–5,61 ng ml⁻¹, Νορεπινεφρίνη: 1,37–9,77 ng ml⁻¹, Κορτιζόλη: 0,95–22,93 ng ml⁻¹, Κάλιο: 2,00–4,51 mmole L⁻¹, Νάτριο: 166,96–196,17 mmole L⁻¹, Οσμωτική πίεση: 288,40–302.41 mOsm Kg⁻¹, Χρόνος προθρομβίνης: 6,78–17,44 sec, Ποσότητα μελανίνης στο δέρμα: 2.78–5,58 µg/mm².

Τα **συμπεράσματα** που εξάγονται από την παρούσα μελέτη είναι: Η **κορτιζόλη** αποδεικνύεται καλός δείκτης οξείας καταπόνησης αλλά όχι και χρόνιας καταπόνησης. Επιπλέον οι τιμές της κορτιζόλης παρουσιάζουν μεγάλη τυπική απόκλιση μέσα στους πληθυσμούς γεγονός που, αφού αποκλείστηκε η πιθανότητα να οφείλεται στην μέθοδο προσδιορισμού, παραπέμπει στον διαχωρισμό των ατόμων σε ομάδες υψηλής και χαμηλής απόκρισης στην κορτιζόλη. Η παραπάνω υπόθεση χρειάζεται φυσικά περαιτέρω διερεύνηση. Από την άλλη πλευρά οι **κατεχολαμίνες** και ιδιαίτερα η νορεπινεφρίνη, εμφανίζεται καλός δείκτης οξείας αλλά και χρόνιας καταπόνησης, παρά τις δυσκολίες στον προσδιορισμό της. Αποδεικνύεται στην παρούσα μελέτη ότι με τον κατάλληλο σχεδιασμό των πειραμάτων και των χειρισμών κατά την δειγματοληψία, είναι δυνατόν να προσδιορισθούν με επιτυχία οι κατεχολαμίνες. Η **γλυκόζη** επίσης αποτελεί αξιόπιστο δείκτη οξείας καταπόνησης, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και για την χρόνια καταπόνηση, όπου παραμένει πάντα εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης. Το **γαλακτικό οξύ** αποδεικνύεται αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης, αλλά και χρόνιας καταπόνησης, Οι **ηλεκτρολύτες** και κυρίως το κάλιο εμφανίζεται αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης, αλλά όχι και χρόνιας καταπόνησης, όπου παραμένουν πάντα εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης. Ο **χρόνος προθρομβίνης** εμφανίζεται στην παρούσα μελέτη ως αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης κατά την οποία τα επίπεδα του μειώνονται και εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της κορτιζόλης και της γλυκόζης. Η ποσότητα **μελανίνης** στο δέρμα σχετίζεται με την χρόνια καταπόνηση και πιθανόν να αποδειχθεί αξιόπιστος δείκτης χρόνιας καταπόνησης. Το **χρώμα** του δέρματος επηρεάζεται από την θερμοκρασία του ύδατος και είναι φωτεινότερο στους 19°C,

ενώ δεν διαφέρει μεταξύ υψηλής και χαμηλής πυκνότητας, επιδεικνύοντας έτσι αξιοπιστία ως δείκτης χρόνιας καταπόνησης. Επιπλέον σε όλα τα πειράματα της παρούσης μελέτης τα μη αναισθητοποιημένα άτομα του φαγκριού έχουν φωτεινότερο χρώμα δέρματος, επιδεικνύοντας αναμφισβήτητα την επίδραση της αναισθησίας στο χρώμα του δέρματος.

Ένα επιπλέον συμπέρασμα που εξάγεται από την παρούσα μελέτη είναι ότι δεν αρκεί ο χαρακτηρισμός της **πυκνότητας** σε kg/m³, για τον καθορισμό των επιπτώσεων αυτής στην φυσιολογική απόκριση των ψαριών. Ο σχετικός όγκος, που καταλαμβάνει ο πληθυσμός των ιχθύων στον συνολικό διαθέσιμο όγκο ύδατος της δεξαμενής και οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται, είναι υπεύθυνες για την διαφορά στην φυσιολογική απόκριση των ομάδων. Επιπλέον το φαγκρί εμφανίζεται ανθεκτικό σε υψηλές πυκνότητες εκτροφής, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα για την καλλιέργεια του είδους. Υπάρχει όμως και η πιθανότητα οι πυκνότητες που χρησιμοποιήθηκαν να ήταν χαμηλές για το συγκεκριμένο είδος.

Επιπλέον από την παρούσα μελέτη φαίνεται η καταπόνηση του φαγκριού κατά την παραμονή του στα **ενυδρεία**, η οποία γίνεται φανερή από τις υψηλές τιμές των κατεχολαμινών και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος.

Τέλος η αφαίρεση του ύδατος της δεξαμενής με **σιφόνι** στο 1/3 του όγκου, 10–15 λεπτά πριν από την δειγματοληψία δεν φαίνεται να βοηθάει ιδιαίτερα στην μείωση της απόκρισης στην καταπόνηση, παρά μόνο να διευκολύνει τον χειριστή στην σύλληψη των ζώων. Σε ερευνητικό επίπεδο υπάρχει η πιθανότητα, σε περίπτωση που τα ψάρια υφίστανται συχνά τον χειρισμό αυτόν, να εθιστούν στην καταπόνηση λόγω μειωμένης στάθμης του ύδατος και αυτό να επηρεάσει τα αποτελέσματα εργασιών.



Εισαγωγή

Η **θερμοκρασία** του νερού έχει επίσης πολύ μεγάλη σημασία για την ευεξία των ιχθύων. Κάθε είδος έχει συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας ανοχής και μια βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσεται καλύτερα. Η θερμοκρασία, είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη λειτουργικότητα και την δομή των πρωτεϊνών στα εξώθερμα ζώα, όπως οι ιχθύς. Και το ενδιαίτημα και η αλλαγή θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει τις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων (Kiyachko and Ozernyuk, 1998). Πάντως, η προσαρμοστικότητα των ψαριών και η ικανότητά τους να επιδεικνύουν φυσιολογική δραστηριότητα σε ακραίες θερμοκρασίες, υποδεικνύει ότι οι κυτταρικές διεργασίες μπορούν να διατηρούνται σε κανονικά επίπεδα ακολουθώντας μια περίοδο θερμικής προσαρμογής (Gerlach et al., 1990). Στα ψάρια, η θερμική προσαρμογή καθορίζεται γενικότερα από μεταβολικές αλλαγές, κατά την διάρκεια των οποίων μια αρχική περίοδος θερμικής καταπόνησης ακολουθείται από μια διαβαθμισμένη αντιστάθμιση. Όταν επιτευχθεί ένα σταθερό μεταβολικό επίπεδο, το ζώο θεωρείται ότι εγκλιματίστηκε πλήρως (Maricondi Massari et al., 1998). Το γεγονός ότι η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας του ύδατος προκαλεί καταπόνηση στα ψάρια είναι γνωστό από πολύ παλιά (Strange et al., 1977). Σήμερα πια είναι γνωστό ότι και η θερμοκρασία εγκλιματισμού έχει επίσης σημασία στην απόκριση των ψαριών στην καταπόνηση από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Strange, J.R., 1980; Cataldi, et al., 1998; Lankford, et al., 2003; Lermen, et al., 2004).

3.2 Διαχειριστικές (ιχθυοκαλλιερητικές) πρακτικές: Διαχειριστικές πρακτικές, όπως συνωστισμός (crowding) (Barton et al., 1980; Leatherland, 1993; Ortuño, Esteban & Meseguer, 2002), σύλληψη (capture) (Frisch and Anderson, 2000; Grutter and Pankhurst, 2000), περιορισμός (confinement) (Barton et al., 1980; Clearwater & Pankhurst, 1996; Ruane et al., 2000, Grutter and Pankhurst, 2000), διάφοροι χειρισμοί (handling) (Barton et al., 1980; Thomas and Robertson, 1991; Frisch and Anderson, 2000; Grutter and Pankhurst, 2000), ταξινόμηση (sorting), διαλογή (grading) (Flos et al., 1988; Leatherland, 1993), μεταφορά (Barton et al., 1980; Davis and Parker, 1986; Frisch and Anderson, 2000), αναισθησία (Thomas and Robertson, 1991), μέτρηση βάρους ή μήκους, προκαλούν καταπόνηση στα ψάρια. Καταπόνηση προκαλούν επίσης στην αλιευτική διαχείριση, διάφορες μέθοδοι σύλληψης, σωματικά τραύματα και η έκθεση σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η **πυκνότητα εκτροφής** στις ιχθυοκαλλιέργειες αναφέρεται ως ο αριθμός των ιχθύων ανά μονάδα τρισδιάστατου χώρου, ο αριθμός των ιχθύων ή το βάρος των ιχθύων ανά μονάδα στατικού ύδατος και η βιομάζα των ιχθύων ανά όγκο ρέοντος ύδατος στη μονάδα του χρόνου (Beleau, 1990). Ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων επηρεάζει την ποιότητα του ύδατος, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιχθύων και γενικά την ευημερία των ζώων.

Οι έννοιες της πυκνότητας: Οι Wedemeyer (1996) και Ellis et al. (2001) περιέγραψαν τρεις διαφορετικές αλλά συσχετιζόμενες έννοιες που είναι βασικές για την κατανόηση της πυκνότητας, ειδικά στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια. Οι

απαραίτητα για την αποφυγή αρνητικών αλλαγών στην ποιότητα του νερού. Η πιο σημαντική φυσιολογική απαίτηση είναι η συνεχής κυκλοφορία αερισμένου νερού σε όλα τα μέρη της μεταφορικής δεξαμενής. Αυτό είναι πολύ βασικό για την υγεία των ψαριών (Wedemeyer, 1996b). Ένα σύστημα αερισμού που συνεχώς αντικαθιστά το απαιτούμενο οξυγόνο που καταναλώνεται από τα ψάρια, είναι επίσης απαραίτητο για την ελαχιστοποίηση του αναπνευστικής καταπόνησης. Η συσσώρευση αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα στις μεταφορικές δεξαμενές των ψαριών, μπορεί να αποτελέσει μια επιπλέον πηγή καταπόνησης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα στις δεξαμενές των ψαριών παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα. Αποτυχία απομάκρυνσης της περίσσειας διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα, έχει σαν αποτέλεσμα πρώτα υπερκαπνία και οξέωση, μετά αναπνευστική καταπόνηση λόγω των Bohr και root φαινομένων, ιστο-υποξία και τελικά νάρκωση και θάνατο (Wedemeyer, 1996b). Μια ποικιλία τεχνικών μετρίασης της καταπόνησης έχουν αναπτυχθεί για να μειώσουν τις αρνητικές φυσιολογικές επιδράσεις της μεταφοράς στην υγεία των ψαριών. Αυτές περιλαμβάνουν πρόσθετα νερού (αναισθητικά, ανόργανα άλατα και πολυμερή), νηστεία, υποθερμία και μειωμένη ένταση φωτός.

Η αναισθησία επίσης αποτελεί ένα πολύ διαδεδομένο χειρισμό στις ιχθυοκαλλιέργειες. Χημικά **αναισθητικά** χρησιμοποιούνται συχνά στις ιχθυοκαλλιέργειες και την έρευνα, προκειμένου να διευκολύνουν τον χειρισμό των ψαριών και να μειώσουν την καταπόνηση. Γενικά τα αναισθητικά ηρεμούν τα ψάρια, αν και η φαρμακοδυναμική και φαρμακοκινητική τους δεν είναι αρκετά κατανοητές (Ross and Ross, 1999). Η αναισθησία αποτρέπει τον τραυματισμό και κάποια αναισθητικά μπορεί να μειώσουν ή να μπλοκάρουν την ενεργοποίηση της απόκρισης στην καταπόνηση. Αποτυχία στην καταστολή της ενεργοποίησης της απόκρισης κατά την διάρκεια καταπόνησης έχει μη επιθυμητά αποτελέσματα (Rotllant et al., 2001; Skjervold et al., 2001). Καθώς τα ψάρια αντιστέκονται και αγωνίζονται λιγότερο κάτω από την επιρροή της αναισθησίας, οι πιθανότητες τραυματισμού μειώνονται. Χωρίς αναισθησία για παράδειγμα μπορεί να καταστραφούν τα αυγά σε μια ωθήκη που βρίσκεται σε φάση ωρίμανσης ή να απομακρυνθεί η βλέννη από τα λείπια. Η χρήση αναισθητικών ως εργαλείο στην ιχθυοκαλλιερητική διαχείριση, για την μείωση της καταπόνησης και την βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος θα εξελιχθεί επιπλέον στο μέλλον. Το κατάλληλο αναισθητικό στην κατάλληλη δόση κατά περίπτωση έχει θετικά αποτελέσματα στην μείωση της καταπόνησης ενώ σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να προκαλέσει επιπλέον καταπόνηση. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή ελαφρά αναισθησία, παρά έντονη (Cooke, et al., 2004). Για παράδειγμα, κατά την μεταφορά, αν τα ψάρια είναι υπό έντονη αναισθησία, η απώλεια ισορροπίας και η παύση της κολύμβησης, μπορεί να προκαλέσει θάνατο από ασφυξία, αν όλα τα άτομα τοποθετηθούν στον πυθμένα ή να τραυματιστούν από χτυπήματα στα τοιχώματα της δεξαμενής (Cooke, et al., 2004). Κατά την επιλογή αναισθητικού θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες, όπως αποτελεσματικότητα, κόστος, διαθεσιμότητα, ευκολία στην χρήση και παράπλευρες επιδράσεις σε ψάρια, ανθρώπους και περιβάλλον (Marking and Meyer, 1985). Ένα συστατικό, το οποίο θα προκαλούσε μια φυσιολογική κατάσταση στην οποία τα ψάρια θα διατηρούσαν

φυσιολογική θέση και ενεργή κίνηση του βραγχιακού καλύμματος, αλλά θα ήταν λιγότερο ευερέθιστα και που θα μείωνε το πλάτος και την διάρκεια της φυσιολογικής απόκρισης, θα ήταν πολύ χρήσιμο στις υδατοκαλλιέργειες (Kenneth and Griffin, 2004).

3.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιχθύων: Οι συμπεριφορικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ψαριών στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή καταπόνησης. Μια σειρά από συμπεριφορές έχουν εξελιχθεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψαριών στους άγριους πληθυσμούς, οι οποίες ενισχύουν την επιτυχία του ατόμου στον ατελείωτο ανταγωνισμό για τροφή, χώρο, ευνοϊκή ποιότητα νερού, κάλυψη για προστασία από θηρευτές και εύρεση συντρόφου. Υπό κανονικές συνθήκες, αυτές οι συμπεριφορές προσαρμόζουν τη ζωή σε ομάδες. Η πιο ενδιαφέρουσα συμπεριφορά είναι η επιθετικότητα. Η επιθετικότητα χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των ατόμων σαν χωροκράτες, σαν κυρίαρχα σε διαχειδικά ιεραρχικά κοινωνικά συστήματα και για την ενίσχυση της επιτυχίας σε ενδοειδικό ανταγωνισμό. Κάποιες επιθετικές συμπεριφορές, όπως δάγκωμα, εφόρμηση, κυνήγι και εμβολισμοί, μπορεί να επιφέρουν σοβαρούς σωματικούς τραυματισμούς. Άλλες, όπως πλευρικές εμφανίσεις, εκφοβίζουν τον ανταγωνιστή χωρίς να απαιτείται άμεση σωματική επαφή. Οι επιθετικές αλληλεπιδράσεις είναι συχνές και έντονες κατά την εγκαθίδρυση σε περιοχές ή σε κοινωνικές ιεραρχίες. Στη συνέχεια μειώνονται και είναι πιθανόν να αναπτυχθούν σχετικά σταθερές σχέσεις μεταξύ κυρίαρχων και κατώτερων ατόμων, διαφορετικά υπάρχει και η επιλογή της μετακίνησης των κατώτερων σε άλλη περιοχή.

Όταν τα ψάρια εκτρέφονται σε εντατικές συνθήκες, όπως σε μακρόστενες δεξαμενές με ταΐστρες διασκορπισμού, επιθετικές συμπεριφορές δεν εξασφαλίζουν τροφή ή κάλυψη και γίνονται απλές παρεκτροπές, προκαλώντας άσκοπα καταπόνηση και σωματικούς τραυματισμούς. Η μετανάστευση σαν εναλλακτική επιλογή στις συχνές επιθετικές διαμάχες με τα κυρίαρχα, επίσης δεν είναι λύση. Σπασμένα ή τραυματισμένα πτερύγια, λόγω επαναλαμβανόμενων δαγκωμάτων και μειωμένη αύξηση λόγω χρόνιας καταπόνησης, παρουσιάζονται συχνά στα ηττημένα άτομα. Άλλες συμπεριφορικές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν αρνητικά την υγεία και την φυσιολογική κατάσταση περιλαμβάνουν, ενδοειδικό ανταγωνισμό, κοινωνικές ιεραρχίες και χωροκρατικότητα. Ο ενδοειδικός ανταγωνισμός συνήθως δεν απασχολεί τις εντατικές καλλιέργειες, αλλά μπορεί να είναι πηγή παθολογίας στις εκτατικές πολυκαλλιέργειες ή σε πειραματικά αναμειγμένους πληθυσμούς (Wald & Wilzbach, 1992).

Προβλήματα υγείας οφειλόμενα σε κοινωνικές κυριαρχίες είναι σχετικά συχνά στις υδατοκαλλιέργειες. Οι κυριαρχικές ιεραρχίες βασίζονται κυρίως στο μέγεθος των ιχθύων και μπορούν να δημιουργηθούν σχετικά γρήγορα σε πολλά είδη, ιδιαίτερα σε χαμηλές πυκνότητες εκτροφής. Αιχμηρά πτερύγια, απώλεια λεπιών από εμβολισμούς, μειωμένη αύξηση, παθολογικές αλλαγές στον γαστρεντερικό ιστό, αυξημένη ευπάθεια σε μολυσματικές ασθένειες λόγω χρόνιας φυσιολογικής καταπόνησης μπορούν να παρατηρηθούν στα ηττημένα άτομα. Στις καλλιέργειες

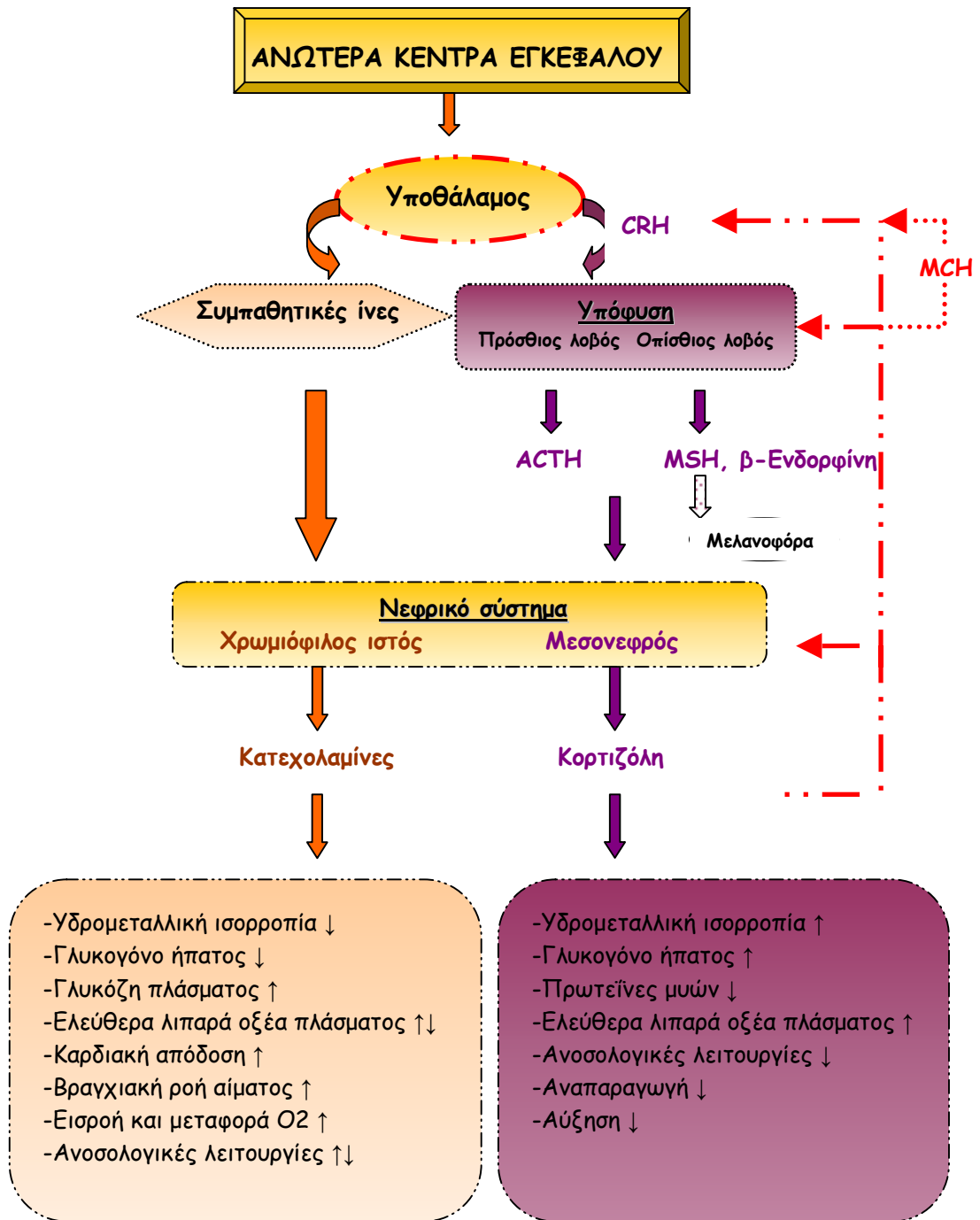
Δομικές	Αριθμός και μέγεθος μεσνεφρικών κυττάρων Διάμετρος του πυρήνα μεσνεφρικών κυττάρων Μορφολογία γαστρικού ιστού Οργανοσωματικοί δείκτες Φυσιολογική κατάσταση
----------------	---

Πίνακας 2. Παραδείγματα δευτερογενών αποκρίσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί σαν δείκτες καταπόνησης στα ψάρια.

4.2 Ενδοκρινική απόκριση: Καταρχήν πρέπει να τονισθεί ότι δεν αποκρίνονται όλα τα ψάρια, στην καταπόνηση με ένα κοινό πρότυπο ενδοκρινικών αλλαγών. Μια μεγάλη σειρά από παράγοντες επηρεάζουν την ενδοκρινική απόκριση ενός ψαριού στην καταπόνηση, οι οποίοι μπορεί να είναι εξωτερικοί (περιβαλλοντικοί) ή εσωτερικοί. Παραδείγματα περιβαλλοντικών παραγόντων είναι η προηγούμενη έκθεση σε ρυπαντές (Hontela et al., 1992), η ποιότητα των υδάτων (Pickering & Pottinger, 1987), η θερμοκρασία (Perry & Reid, 1994), ενώ εσωτερικών παραγόντων είναι το στάδιο ανάπτυξης, η σεξουαλική ωρίμανση (Pottinger, Balm & Pickering, 1995). Επιπλέον, υπάρχουν και ενδογενείς ενδοκρινικοί ρυθμοί, ημερήσιοι και εποχιακοί, στην συγκέντρωση τουλάχιστον κάποιων ορμονών απόκρισης στην καταπόνηση (Bry, 1982; Pickering & Pottinger, 1983).

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η καταπόνηση (όπως ανοξία (Perry & Reid, 1992), οξέωση (Brown & Whitehead, 1995), εξαντλητική άσκηση (Wood et al., 1990), κοινωνικές αλληλεπιδράσεις (Sloman et al., 2002)) στα ψάρια συνοδεύεται από ταχύτατες αλλαγές στις συγκεντρώσεις των κατεχολαμινών στο πλάσμα, κυρίως αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης. Οι κατεχολαμίνες προέρχονται κυρίως από τα κύτταρα του χρωμιόφιλου ιστού (chromaffin cells), τα οποία βρίσκονται διασκορπισμένα στα νεφρά και τα οπίσθια τοιχώματα της κεντρικής φλέβας (Reid, Furimsky & Perry, 1994).

Η καταπόνηση διεγείρει επίσης την βιοσύνθεση κατεχολαμινών (Reid, Furimsky & Perry, 1994). Η ικανότητα διατήρησης των αποθεμάτων κατεχολαμινών σε «κανονικά» επίπεδα, παρά την απόκριση στην καταπόνηση, εξασφαλίζει ότι ικανές ποσότητες είναι διαθέσιμες για απόκριση σε επιπλέον καταπόνηση. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι επαναλαμβανόμενη καταπόνηση μπορεί να



Εικόνα 1. ΗΠΙ (Υποθαλαμικός-Υπόφυσιακός-Μεσонеφρικός) άξονας στους ιχθύς. Τα συνεχή βέλη αντιπροσωπεύουν θετικές (διεγερτικές) δράσεις, ενώ τα διακεκομμένα (κόκκινο χρώμα) αντιπροσωπεύουν αρνητικές (ανασταλτικές) δράσεις.

Η πρώτη ορμόνη στο μονοπάτι είναι η ορμόνη απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH). Οι νευρώνες που εκκρίνουν CRH είναι πολύ σημαντικοί για την απόκριση, γιατί εκτός της επιρροής τους στις συγκεντρώσεις κορτιζόλης μέσω του ΗΠΙ άξονα τροποποιούν επίσης την απελευθέρωση των κατεχολαμινών

Η ένταση της απόκρισης στην καταπόνηση πιθανόν να αυξάνει με την ανάπτυξη, αν και οι ενδείξεις είναι πολύ περιστασιακές. Πάντως αυτή η πιθανή αύξηση στην ικανότητα απόκρισης στην καταπόνηση σχετιζόμενη με την ανάπτυξη ίσως να μην αντανakλάται στα ενήλικα ψάρια, τουλάχιστον για τις πρωτογενείς αποκρίσεις. Ο Pottinger et al. (1995) ανέφερε ότι το ώριμο αρσενικό της ιριδιζουσας πέστροφας παρουσίασε μικρότερες αποκρίσεις και στην κορτιζόλη και στην ACTH σε έντονη καταπόνηση, σε σύγκριση με ανώριμα άτομα, υπονοώντας ότι ανάδρομη ισορροπία «set point» του HPI άξονα ίσως μειώνεται με την έναρξη της ωριμότητας.

4.8 Περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την απόκριση: Σχεδόν όλοι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί (αναισθησία, θερμοκρασία εγκλιματισμού, ακραίες αλατότητες, διατροφή, ποιότητα νερού, η ώρα της ημέρας, φωτισμός, πυκνότητα ψαριών, χρώμα υποστρώματος) επηρεάζουν την ένταση της απόκρισης των ψαριών στην καταπόνηση.

Η πρακτική σημασία του φαινομένου σχετίζεται περισσότερο με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αυτοί οι παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όχι μόνο κατά τον σχεδιασμό πειράματος, αλλά και όταν κάνουμε συγκρίσεις μεταξύ πληθυσμών ή συγκρίσεις στο χρόνο, σε σχέση με το πώς αποκρίνονται ή επηρεάζονται τα ψάρια από την καταπόνηση. Η γνώση συγκεκριμένων παραγόντων που μπορούν να τροποποιήσουν τις πρωτογενείς ή δευτερογενείς αποκρίσεις έχει και πρακτική σημασία, από την άποψη ότι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτές τις αποκρίσεις σαν δείκτες σε προσπάθειες μετρίασης των αποτελεσμάτων της καταπόνησης στις ιχθυοκαλλιέργειες, για παράδειγμα η χρήση αλάτων ή αναισθητικών για την μείωση της καταπόνησης στη διάρκεια χειρισμών ή μεταφοράς (Wedemeyer, 1996).

Ένας ενδιαφέρον παράγοντας στις υδατοκαλλιέργειες, είναι αυτός του εθισμού στην καταπόνηση. Ψάρια σε αιχμαλωσία παρουσιάζουν ετοιμότητα ή εθισμό σε επαναλαμβανόμενες διαταραχές (Barton et al., 1987; Schreck et al., 1995). Για παράδειγμα ο Barton et al. (1987), παρατήρησαν ότι μετά από 10 εβδομάδες, επιβολής μιας μεμονωμένης σύντομης διαταραχής κάθε μέρα, η

διάρκεια της καταπόνησης βρίσκεται κάτω από εξωτερική και εσωτερική επιρροή (π.χ. θερμοκρασία υδάτων, ποιότητα υδάτων και σεξουαλική ωριμότητα). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι ψάρια του ίδιου είδους, αλλά με διαφορετική γενετική καταγωγή μπορεί να διαφέρουν αξιολογώντας στην κορτικοστεροειδή τους απόκριση στην καταπόνηση.

Κάποιες ενδείξεις ότι η απόκριση στην καταπόνηση μπορεί να είναι γενετικά καθορισμένη στα ψάρια προήλθαν από την εμπειρική προσέγγιση που εφήρμοσαν οι Pottinger et al. (1992) για την εκτίμηση του εάν ιριδιζουσες πέστροφες χαρακτηριζόμενες ως HR (High Responsiveness, υψηλής απόκρισης) και LR (Low Responsiveness, χαμηλής απόκρισης) στην καταπόνηση, θα γεννούσαν απογόνους με παρόμοιες τάσεις. Οι διασταυρώσεις που έγιναν ήταν HR θηλυκά Χ HR αρσενικά και LR θηλυκά Χ LR αρσενικά (Pottinger, Moran & Morgan, 1994). Οι απόγονοι αυτών των διασταυρώσεων υποβλήθηκαν σε καταπόνηση (1 ώρα εγκλεισμού (confinement)), σε σταθερά διαστήματα ενός μηνός για ένα χρόνο. Γενικά οι απόγονοι των υψηλής απόκρισης γονέων επέδειξαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη αύξηση κορτιζόλης κάτω από αυτές τις συνθήκες σε σύγκριση με τους απόγονους των χαμηλής απόκρισης γονέων. Όταν μελετήθηκε η απόκριση της κορτιζόλης σε συνεχές εγκλεισμό, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα κορτιζόλης παρατηρήθηκαν 4 ώρες μετά την έναρξη του εγκλεισμού.

Ένα πειραματικό σχέδιο καταλληλότερο για την εξαγωγή ποσοτικών πληροφοριών για τις γενετικές επιρροές σε χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με την καταπόνηση, εφαρμόστηκε από τους Heath et al. (1993) σε σολομό. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν ότι το γενετικό και περιβαλλοντικό υπόστρωμα των ιχθύων μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις στην απόκριση στην καταπόνηση.

Η πιο επικυρωμένη προσπάθεια εκτίμησης της επιτευξιμότητας της επιλογής της απόκρισης στην καταπόνηση στα ψάρια, είναι αυτή του Fenolden και των συνεργατών του. Το σκεπτικό της εργασίας τους ήταν να χρησιμοποιήσουν την απόκριση στην καταπόνηση σαν έμμεσο δείκτη της αντίστασης στις ασθένειες. Τα είδη που χρησιμοποίησαν ήταν ο σολομός του ατλαντικού και η ιριδιζουσα πέστροφα. Το συμπέρασμα τους ήταν ότι τα δεδομένα τους υποστήριζαν ότι η

Επίσης πολλές φορές επειδή τα αποτελέσματα των κλασικών δεικτών καταπόνησης είναι αντικρουόμενα ή αδυνατούν να αποκαλύψουν το επίπεδο καταπόνησης στο οποίο βρίσκεται το ζώο, παρουσιάζεται η ανάγκη εξέτασης επιπλέον αιματολογικών χαρακτηριστικών. Έτσι φάνηκε λογική και χρήσιμη η αναζήτηση νέων δεικτών καταπόνησης. Το χρώμα του δέρματος και η συγκέντρωση μελανίνης στο δέρμα, θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελούν δείκτες καταπόνησης, μιας και το μόνο μακροσκοπικό χαρακτηριστικό που φαίνεται να αντιδρά και να μεταβάλλεται ραγδαία σαν απόκριση στην καταπόνηση στο συγκεκριμένο είδος είναι το χρώμα του δέρματος. Ο χρόνος προθρομβίνης επίσης έχει φανεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου να μεταβάλλεται σε καταστάσεις καταπόνησης.



Υλικά και μέθοδοι

1. Ψάρια και πειραματικές συνθήκες

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις κλειστές πειραματικές εγκαταστάσεις του Τμήματος Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.Κ.Ε.Θ.Ε., στο Ηράκλειο Κρήτης και το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Χρησιμοποιήθηκαν ψάρια του είδους *Pagrus pagrus* (Φαγκρί).

Οι πειραματικές πολυεστερικές, κυλινδρικές δεξαμενές, ήταν όγκου 500L, βάθους 1m και εξοπλισμένες με συνεχή παροχή θαλασσινού ύδατος (ανανέωση 125%), με εξόδους για την απομάκρυνση των αποβλήτων και παροχή οξυγόνου. Το νερό πριν φτάσει στις δεξαμενές περνάει από μηχανικό φίλτρο για την απομάκρυνση των μεγάλων αιωρούμενων συστατικών, από χώρο καταβύθισης των βαρέων αδιάλυτων συστατικών, καθώς επίσης και από βιολογικό φίλτρο για την διάσπαση της αμμωνίας σε μη τοξικές ενώσεις. Για να αποφεύγεται η διαφυγή των ψαριών, οι δεξαμενές σκεπάστηκαν με ειδικά κατασκευασμένα καλύμματα από πλαστικό δίχτυ. Ο τεχνητός φωτισμός επετεύχθη με τη βοήθεια φωτιστικών (λάμπες φθορίου, full spectrum), εντάσεως $0,5 \pm 0,1 \mu\text{mol photons} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 14L:10D (14 h φως και 10 h σκοτάδι). Η μέτρηση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης οξυγόνου, ελάμβανε χώρα κάθε μέρα τις πρωινές ώρες.

Οι πειραματικές εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης, αποτελούνται από γυάλινα ενυδρεία, όγκου 264L/ενυδρείο και διαστάσεις 120X40X55cm (120 cm, μήκος, 40 cm, πλάτος και 55 cm, ύψος). Επίσης είναι εξοπλισμένα με συστήματα βιολογικού και μηχανικού φίλτρου (System Aquarium, Kit 17GB, της εταιρίας TUNZE), το οποίο ανακυκλώνει το νερό με ρυθμό 300–700L/h, με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για την αποστείρωση του ύδατος (UV Sterilizer, Q81L, 8Watt) και υπερχειλίση (TUNZE).

Η μέτρηση αμμωνίας, νιτρικών και νιτρωδών αλάτων και pH του ύδατος των ενυδρείων ελάμβανε χώρα, δύο φορές την εβδομάδα, με την βοήθεια εμπορικών τεστ, Hagen και pH-μέτρου (CRISON GLP21). Τα ενυδρεία παρέμειναν καλυμμένα εξωτερικά με μαύρο πλαστικό και η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 14L:10D (14 h φως και 10 h σκοτάδι). Ο φωτισμός επετεύχθη με τη βοήθεια φωτιστικών (λάμπες

φθορίου, full spectrum), εντάσεως $2.52 \mu\text{mol photons}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Η αλατότητα του ύδατος στα ενυδρεία, ρυθμίστηκε με θαλασσινό άλας, Tropical Marine.

Τα ψάρια κατανάλωναν εμπορική, τεχνητή τροφή (INVE™), 2% του βάρους τους ημερησίως και η παροχή της τροφής γινόταν με το χέρι, δύο φορές την ημέρα. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 18 ± 1 °C και η συγκέντρωση διαλυμένου O_2 , $7,44 \text{ mg L}^{-1}$. Η αλατότητα ήταν κατά την διάρκεια όλων των πειραμάτων 40 ‰. Τα ψάρια πέρασαν μια περίοδο προσαρμογής, μίας εβδομάδας, στις νέες συνθήκες πριν την έναρξη κάθε πειράματος.

Δειγματοληψία

Σε όλα τα πειράματα πριν από τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας τα ψάρια έμεναν σε ασιτία από το βράδυ της προηγούμενης ημέρας. Για την διευκόλυνση της δειγματοληψίας και την ελαχιστοποίηση της επίδρασης της καταπόνησης λόγω χειρισμών, όπου θεωρήθηκε απαραίτητο, 10–15 min πριν την σύλληψη των ψαριών κατέβαινε η στάθμη του νερού της δεξαμενής στο 1/3 με την χρήση σιφονιού. Στη συνέχεια τα ψάρια με την βοήθεια απόχης μεταφερόταν γρήγορα σε πλαστικά δοχεία (των 50L) που περιείχαν αναισθητικό (0,3 ml/l Ethylenglycol-monoxyphenylether, Merck). Όταν τα ψάρια ήταν πλέον αναισθητοποιημένα, μεταφερόταν στον πάγκο εργασίας, με το κεφάλι σκεπασμένο με μία πετσέτα, και ακολουθούσε η αιμοληψία από την ουραία φλέβα και η μέτρηση του χρώματος του δέρματος. Το αίμα συλλεγόταν με σύριγγα μίας χρήσεως του 1ml και στην συνέχεια μεταφέρονταν σε σωληνάκια με ή χωρίς αντιπηκτικό (EDTA ή Κιτρικό νάτριο). Στην συνέχεια μετρούνταν το βάρος και το μεσουραίο μήκος. Μετά την αιμοληψία τα ψάρια τοποθετούνταν σε πλαστικά δοχεία των 50L με τρεχούμενο θαλασσινό νερό, για την ανάκτηση των αισθήσεων τους και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε καθαρές δεξαμενές. Η φυγοκέντρωση του αίματος έγινε σε θερμοκρασία 4° C, στις 3000 rpm, για 15 min. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο (πλάσμα ή ορός) μεταφερόταν σε erpendorfs και φυλάσσονταν στους -20 °C μέχρι την πραγματοποίηση των προσδιορισμών.

2. Σχεδιασμός πειραμάτων

Πείραμα 1

1.1. Ανάπτυξη και αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης.

Για την ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε αίμα που συλλέχθηκε από φαγκριά βάρους $121,8 \pm 13,9\text{g}$ και μεσουραίου μήκους $16,9 \pm 0,6\text{cm}$ (Mean \pm SD). Η αιμοληψία πραγματοποιούνταν όπως περιγράφηκε παραπάνω και ο προσδιορισμός της κορτιζόλης έγινε με ραδιοανοσομετρική μέθοδο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασίας του Οργανισμού Παγκόσμιας Υγείας (WHO, World Health Organization) (Sufi et al., 1994), το οποίο προσαρμόστηκε στα δεδομένα των θαλασσινών ιχθύων. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η καταλληλότητα των δειγμάτων ορού και πλάσματος για τον προσδιορισμό και έγιναν οι δοκιμασίες παραλληλισμού και ανάκτησης για τον έλεγχο της μεθόδου που προέκυψε.

1.2. Αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού των κατεχολαμινών.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού των κατεχολαμινών, χρησιμοποιώντας εμπορικές συσκευασίες KatCombi RIA, RE29291, της εταιρίας IBL (Immuno Biological Laboratories), πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία παραλληλισμού.

Πείραμα 2

Αξιολόγηση χρήσης αναισθησίας

2.1. Ηθολογική απόκριση των ψαριών στην αναισθησία

Για κάθε χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν 6 ψάρια, βάρους $121,8 \pm 13,9\text{g}$ και μεσουραίου μήκους $16,9 \pm 0,6\text{mm}$ (mean \pm SD) (σύνολο 48 ψάρια). Οι χειρισμοί

είχαν ως εξής: χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδών αναισθητικά, 2-φαινοξυαιθανόλη ή αιθυλένγλυκολ-μονοφαινυλαιθέρας (2-phenoxyethanol ή Ethylenglycol-monoxyphenylether), Merck, σε συγκεντρώσεις 0,3, 0,5, 0,7 και 0,9 ml/L και γαρυφαλέλαιο ή ευγενόλη (clove oil ή eugenol), Μπακάκος, σε συγκεντρώσεις 0,03, 0,06, 0,09 και 0,12 ml/L. Η σύλληψη των ζώων με την απόχη και η μεταφορά τους στο πλαστικό δοχείο, όγκου 10L, που περιείχε το αναισθητικό έγινε με πολύ ήπιες και γρήγορες κινήσεις για την αποφυγή καταπόνησης και στην συνέχεια έγινε παρακολούθηση και χρονομέτρηση των σταδίων της αναισθησίας μέχρι το στάδιο 3 (χειρουργική αναισθησία) και της ανάνηψης από αυτήν μέχρι την πλήρη ανάκαμψη (αποκατάσταση κολύμβησης), σύμφωνα με τον Πίνακα 2.1.1.

<i>Στάδιο</i>	<i>Ονομασία</i>	<i>Χαρακτηριστικά</i>
1 A	Ελαφρά καταπράυνση	Μειωμένη κινητικότητα, αερισμός και ελαφρά μειωμένος ρυθμός επικαλυμματικού
1 B	Βαθιά καταπράυνση	Αντίδραση μόνο σε έντονο ερέθισμα και ελαφρά μειωμένος ρυθμός επικαλυμματικού
2 A	Ελαφρά αναισθησία	Μερική απώλεια ισορροπίας (καλή αναλγησία), ακανόνιστη κολύμβηση, αυξημένος ρυθμός επικαλυμματικού
2 B	Βαθύτερη αναισθησία	Απώλεια μυϊκού τόνου, ολοκληρωτική απώλεια ισορροπίας, αερισμός σχεδόν μηδενικός, χαμηλός αλλά τακτικός ρυθμός επικαλυμματικού
3	Χειρουργική αναισθησία	Δεν αντιδρά, χαμηλές και ακανόνιστες κινήσεις επικαλυμματικού, πολύ χαμηλός καρδιακός ρυθμός, απώλεια αντανάκλαστικών
4	Κατάρρευση νευρικού	Παύση αερισμού, επικαλυμματικού, καρδιάς Θάνατος
Ανάνηψη A		Αποκατάσταση ισορροπίας
Ανάνηψη B		Αποκατάσταση κολύμβησης

Πίνακας 2.1.1. Στάδια αναισθησίας, τροποποιημένο από Ross and Ross, 1999; Stoskopf, 1993; Wooster et al., 1993.

2.2. Φυσιολογική απόκριση των ψαριών στην αναισθησία

Χρησιμοποιήθηκαν φαγκριά βάρους $121,8 \pm 13,9$ g και μεσουραίου μήκους 16,9

$\pm 0,6$ mm (mean \pm SD). Έγινε δειγματοληψία και προσδιορισμός των δεικτών καταπόνησης σε μη αναισθητοποιημένα ψάρια καθώς και σε ψάρια που είχαν υποστεί αναισθησία είτε σε 2-φαινοξυαιθανόλη, είτε σε γαρυφαλέλαιο. Τα ψάρια κάθε ομάδας είχαν τοποθετηθεί σε δεξαμενές των 150L ανά δύο (2) και η δειγματοληψία ελάμβανε χώρα από δύο άτομα ταυτόχρονα, αφενός για να αποφύγουμε πιθανή καταπόνηση του ψαριού που θα έμενε σε διαφορετική περίπτωση δεύτερο και αφετέρου για να επισπεύσουμε την διαδικασία, λόγω του ότι οι κατεχολαμίνες εκκρίνονται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος και έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (λίγα λεπτά).

Πείραμα 3

Απόκριση των ψαριών σε οξεία καταπόνηση

3.1. Σύλληψη και έκθεση στον αέρα (συγχρωτισμός)

Χρησιμοποιήθηκαν 18 ψάρια, βάρους $121,8 \pm 13,9$ g και μεσουραίου μήκους $16,9 \pm 0,6$ mm (mean \pm SD), τα οποία βρισκόταν σε 3 δεξαμενές των 500L (6 ψάρια/δεξαμενή). Τα 6 ψάρια από την μια δεξαμενή καταπονήθηκαν έντονα (Ομάδα Α), κυνηγώντας τα για 10 λεπτά, ήπια με την απόχη, μέσα στην δεξαμενή και στην συνέχεια συλλαμβάνοντας τα και εκθέτοντας τα στον αέρα μέσα σε δίχτυ, για 3-4 λεπτά. Τα ψάρια στην συνέχεια επέστρεψαν στην δεξαμενή και από εκεί μεταφέρονταν σε δοχείο 10L με αναισθητικό 2-φαινοξυαιθανόλη (0,3ml/L), όπου αφού αναισθητοποιούνταν γινόταν η δειγματοληψία και η μέτρηση βάρους και μεσουραίου μήκους. Τα 6 ψάρια από την δεύτερη δεξαμενή χρησιμοποιήθηκαν για ομάδα ελέγχου (Ομάδα Γ, control) χωρίς να καταπονηθούν (οι χειρισμοί ήταν πολύ ήπιοι και ταχύτατοι). Τέλος τα 6 ψάρια από την τρίτη δεξαμενή (Ομάδα Β) επίσης υπέστησαν την λιγότερη δυνατή καταπόνηση, όπως και αυτά της Ομάδας Γ με ήπιους και γρήγορους χειρισμούς, με την διαφορά ότι σε αυτήν την περίπτωση, 10-15 min πριν την σύλληψη των ψαριών κατέβαινε η στάθμη του νερού της δεξαμενής στο 1/3 με

την χρήση σιφονιού.

3.2. Κινητική της απόκρισης σε οξεία καταπόνηση

28 ψάρια, βάρους $121,8 \pm 13,9$ g και μεσουραίου μήκους $16,9 \pm 0,6$ mm (mean \pm SD) τοποθετήθηκαν σε μία δεξαμενή όγκου 500L, σε θερμοκρασία $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Μετά από την περίοδο προσαρμογής 5 ημερών, τα ψάρια υπέστησαν οξεία καταπόνηση, αδειάζοντας πολύ γρήγορα το νερό της δεξαμενής και αφήνοντας τα εκτεθειμένα εκτός ύδατος για 1 λεπτό. Στην συνέχεια προστέθηκε ξανά θαλασσινό νερό στην δεξαμενή και ακολούθησαν αιμοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα (0,5, 2, 24 και 48h) μετά τον παράγοντα καταπόνησης. Τα ψάρια μετά την πρώτη αιμοληψία, μαρκαρίστηκαν και μπήκαν σε χωριστά πλαστικά δίχτυα στην ίδια δεξαμενή, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στις επόμενες δειγματοληψίες.

Πείραμα 4

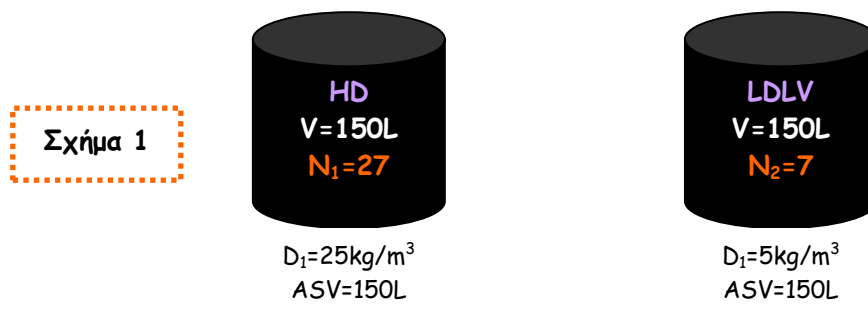
Πυκνότητα εκτροφής και καταπόνηση

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 122 φαγκριά, βάρους $121,8 \pm 13,9$ g και μεσουραίου μήκους $16,9 \pm 0,6$ mm (mean \pm SD), τα οποία τοποθετήθηκαν τυχαία σε 6 δεξαμενές των 500L. Η στάθμη του νερού της δεξαμενής μπορούσε να ρυθμιστεί με τη χρήση σωλήνων εκροής διαφορετικού ύψους.

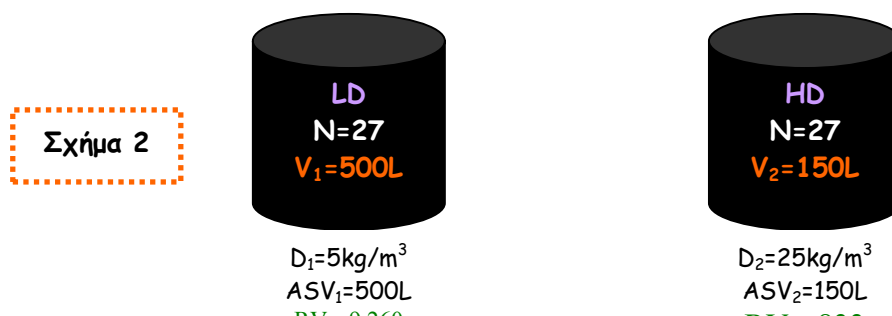
Για την αλλαγή της πυκνότητας εκτροφής χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τρόποι: 1) αλλαγή του αριθμού των ατόμων (group size) στον ίδιο όγκο ύδατος (Πείραμα 4.1), 2) αλλαγή του όγκου του ύδατος διατηρώντας σταθερό τον αριθμό των ατόμων (Πείραμα 4.2) και 3) συνδυασμός των δύο παραπάνω, δηλαδή αλλαγή και του αριθμού των ψαριών και του όγκου του ύδατος, διατηρώντας όμως χαμηλή πυκνότητα εκτροφής ($5\text{kg}/\text{m}^3$) (Πείραμα 4.3). Οι αντίστοιχοι χειρισμοί παρουσιάζονται αναλυτικά κατωτέρω.

Συμβολισμοί: **HD**=Υψηλή πυκνότητα (High Density), **LDLV**=Χαμηλή πυκνότητα και χαμηλός όγκος ύδατος (Low Density-Low Volume), **LD**=Χαμηλή πυκνότητα (Low Density), **D**=Πυκνότητα (Density) και **ASV**=Διαθέσιμος όγκος κολύμβησης (Available Swimming Volume).

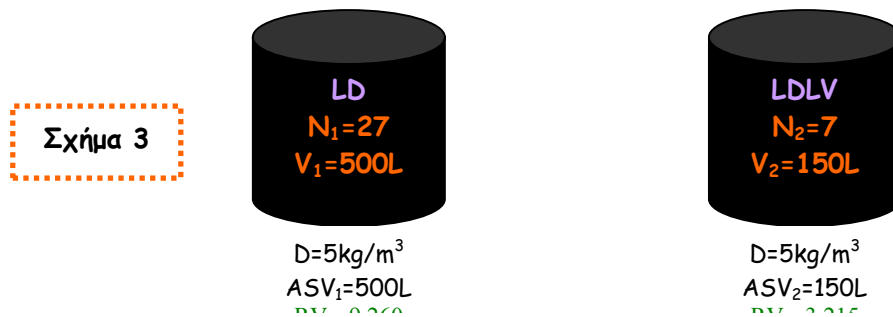
Πείραμα 4.1. Δύο δεξαμενές με ίδιο όγκο νερού ($V=150L$) και διαφορετικό αριθμό ψαριών ($N_1=27$ και $N_2=7$) (Σχήμα 1). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουμε διαφορετική πυκνότητα ($D_1=25kg/m^3$ και $D_2=5kg/m^3$) και ίδιο διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (Available swimming Volume (ASV)) ($ASV=150L$).



Πείραμα 4.2. Δύο δεξαμενές με τον ίδιο αριθμό ψαριών ($N=27$) και διαφορετικό όγκο νερού ($V_1=500L$ και $V_2=150L$) (Σχήμα 2). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουμε διαφορετική πυκνότητα ($D_1=5kg/m^3$ και $D_2=25kg/m^3$) και διαθέσιμο όγκο κολύμβησης ($ASV_1=500L$ και $ASV_2=150L$).



Πείραμα 4.3. Δύο δεξαμενές με διαφορετικό όγκο νερού ($V_1=500L$ και $V_2=150L$) και διαφορετικό αριθμό ψαριών ($N_1=27$ και $N_2=7$) (Σχήμα 3). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουμε ίδια πυκνότητα ($D=5kg/m^3$) και διαφορετική διαθέσιμο όγκο κολύμβησης ($ASV_1=500L$ και $ASV_2=150L$).



Πείραμα 5

Θερμοκρασία εκτροφής και καταπόνηση

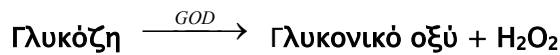
Χρησιμοποιήθηκαν 60 ψάρια, βάρους $153,1 \pm 31g$ και μεσουραίου μήκους (FL) $17,7 \pm 1,3mm$ (mean \pm SD) που τοποθετήθηκαν τυχαία σε 6 x 264L ενυδρεία (10 άτομα/ενυδρείο). Τα ενυδρεία είχαν ανά δύο την ίδια θερμοκρασία, ήτοι 15, 19 και 25°C. Μετά από 1 εβδομάδα, έγινε μέτρηση του χρώματος του δέρματος, του pH μυών και μέτρηση βάρους και μεσουραίου μήκους σε 5 ψάρια από κάθε ενυδρείο (10 άτομα/θερμοκρασία). Το pH των μυών μετρήθηκε με τη χρήση ειδικού pH-μετρου (GRISON GLP21), σε ψάρια που είχαν θανατωθεί μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αναισθητικό και αφού είχε επέλθει λύση του δέρματος με νυστέρι. Τα υπόλοιπα 30 ψάρια παρέμειναν άλλη 1 εβδομάδα (σύνολο 2 εβδομάδες) στις ίδιες συνθήκες και κατόπιν έγινε μέτρηση βάρους και μεσουραίου μήκους (10 άτομα/θερμοκρασία), μέτρηση χρώματος του δέρματος, συλλογή αίματος (ορός και πλάσμα (αντιπηκτικά: EDTA και Κιτρικό νάτριο)), και τμήματος δέρματος (από την ραχιαία και την κοιλιακή επιφάνεια του ζώου) για τον προσδιορισμό της μελανίνης.

3. Προσδιορισμοί

3.1. Προσδιορισμός γλυκόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (Biosis, Hellas). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι ενζυματική (GOD-PAP), χρωματομετρική και η αρχή της στηρίζεται στο ότι: Η

γλυκόζη του πλάσματος, παρουσία του ενζύμου γλυκόζη οξειδάση (GOD), μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂). Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μαζί με αμινοφαιναζόνη και φαινολικό παράγωγο, με την βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD), παράγει το τελικό προϊόν ερυθρού χρώματος. Η ένταση του χρώματος και η απορρόφηση του διαλύματος στα 510 nm (σε φασματοφωτόμετρο, Pharmacia LKB Ultrospec III), είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο διάλυμα. Σχηματικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:



Εκτέλεση: Κάθε δείγμα υπέστη την παρακάτω διαδικασία δύο φορές, όπως και το πρότυπο διάλυμα (Standard), περιεκτικότητας σε γλυκόζη 100mg/dl, για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ακρίβειας στα αποτελέσματα.

- Τα αντιδραστήρια και το πλάσμα έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια έγινε η ανασύσταση των αντιδραστηρίων: Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα στο φιαλίδιο που περιέχει τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή.
- Κατόπιν προστίθενται σε δοκιμαστικά σωληνάρια τα παρακάτω:

	Δείγμα	Πρότυπο	Τυφλό
Πρότυπο	-	10μl	-
Δείγμα	10μl	-	-
Αντιδραστήριο εργασίας	1 ml	1 ml	1 ml

- Ακολούθησε επώαση τους σε υδατόλουτρο στους 37°C επί 15 min
- Ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα (Vortex).
- Τέλος αφού μεταφέρθηκαν σε ειδικές γυάλινες κιβέττες, φωτομετρήθηκαν έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 510 nm.
- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης σε κάθε δείγμα γίνεται με

βάση τον τύπο:

$$\text{Γλυκόζη (mg \%)} = C_{\text{std}} * \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{std}}}$$

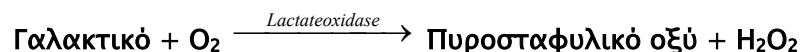
$A_{\text{δείγματος}}$ = τιμή απορρόφησης δείγματος και

A_{std} = τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος γλυκόζης (100 mg %).

Για την μετατροπή των mg% σε mmol/l, η τιμή πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό 5,55.

3.2. Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του γαλακτικού πραγματοποιήθηκε τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (bioMerieux, France). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι ενζυματική, χρωματομετρική και στηρίζεται στην εξής αρχή: Το Γαλακτικό του πλάσματος, παρουσία του ενζύμου γαλακτόξειδάση, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O_2) και μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μαζί με 4-χλωροφαινόλη και 4-αμινοαντιπυρίνη, με τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD), παράγει κουϊνονιμίδη, H_2O και HCl . Η ένταση του χρώματος και η απορρόφηση (Absorbance) του διαλύματος στα 505 nm, είναι ανάλογες της συγκέντρωσης του Γαλακτικού στο διάλυμα. Σχηματικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:



Εκτέλεση: Κάθε δείγμα υπέστη την παρακάτω διαδικασία δύο φορές, όπως και το πρότυπο διάλυμα (Standard), 3,00 mmol LAC/l, για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ακρίβειας στα αποτελέσματα.

- Τα αντιδραστήρια και το πλάσμα έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια έγινε η ανασύσταση των αντιδραστηρίου: Προσθέσαμε 10ml ρυθμιστικό διάλυμα (pH=6.8) στο φιαλίδιο που περιείχε τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή.
- Κατόπιν προστίθενται σε δοκιμαστικά σωληνάρια τα παρακάτω:

Δείγμα	Πρότυπο	Τυφλό
--------	---------	-------

Πρότυπο	-	10μl	-
Δείγμα	10μl	-	-
Αντιδραστήριο εργασίας	1ml	1ml	1ml

- Ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα (Vortex).
- Ακολούθησε επώαση τους σε θερμοκρασία δωματίου (RT) 20–25°C για 5 min.
- Και τέλος αφού μεταφέρθηκαν σε ειδικές γυάλινες κιβέττες φωτομετρήθηκαν έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 505 nm.
- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος σε κάθε δείγμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Γαλακτικό οξύ (mmol/l)} = C_{\text{std}} * \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{std}}}$$

$A_{\text{δείγματος}}$ = τιμή απορρόφησης δείγματος και

A_{std} = τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος γαλακτικού οξέος (3mmol/l).

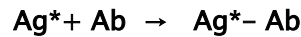
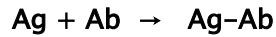
3.3. Προσδιορισμός κατεχολαμινών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των κατεχολαμινών (Επινεφρίνη, Νορεπινεφρίνη) έγινε με ραδιοανοσομετρική μέθοδο (RIA, Radioimmunoassay), χρησιμοποιώντας εμπορικές συσκευασίες KatCombi RIA, RE29291, της εταιρίας IBL (Immuno Biological Laboratories).

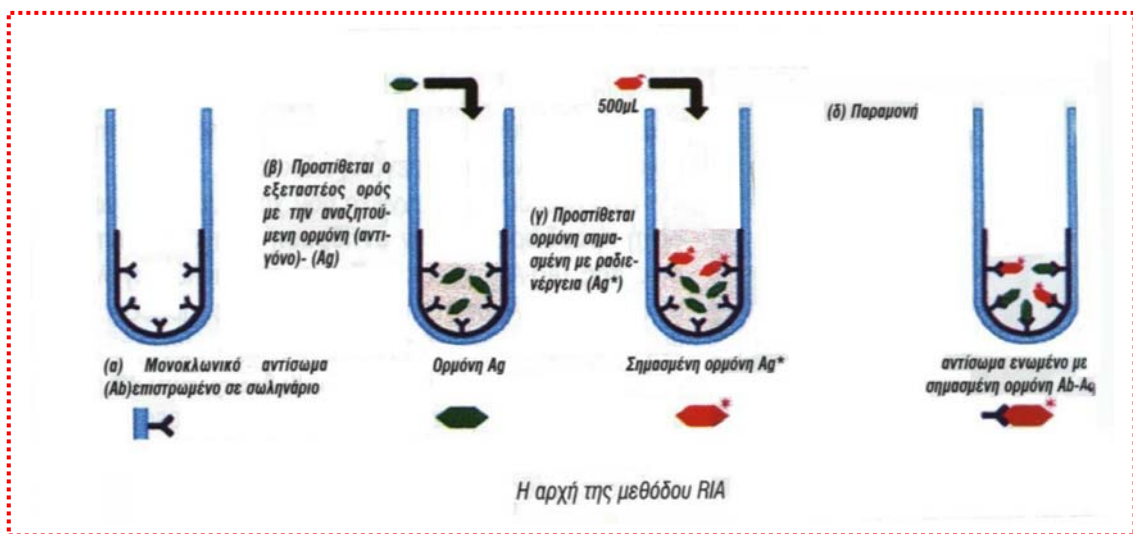
Αρχή της μεθόδου RIA: Σε σωληνάρια με επιστρωμένο αντίσωμα Ab στον πυθμένα, προστίθεται το πλάσμα που περιέχει το προς προσδιορισμό αντιγόνο Ag (ορμόνη) και αντιγόνο Ag* σημασμένο με ραδιενεργό ιώδιο ¹²⁵I (ιχνηθέτης).

Το δείγμα επωάζεται, για 15–20h σε θερμοκρασία 2–8°C. Κατά τη διάρκεια της επώασης η προς προσδιορισμό ορμόνη και η ραδιενεργά σημασμένη ορμόνη ανταγωνίζονται για να προσδεθούν στις ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος. Όσο περισσότερη ορμόνη υπάρχει στο δείγμα, τόσο λιγότερη ραδιενεργά σημασμένη ορμόνη θα ενωθεί με το αντίσωμα.

Σχηματικά οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι οι ακόλουθες:



Μετά το πέρας της επώασης και την απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων, μετράται η ακτινοβολία σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (γ-counter). Από τις μετρήσεις των προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, σε cpm (counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό) κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς. Με βάση αυτή την καμπύλη βρίσκεται η συγκέντρωση της ορμόνης στο δείγμα.



Εκτέλεση: Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Χρησιμοποιήθηκε πλάσμα (EDTA) φαγκριού αραιωμένο σε αναλογία 1:5 με φυσιολογικό ορό, πριν από την διαδικασία.

Πρώτη ημέρα:

- Προσθήκη 1ml από κάθε πρότυπο διάλυμα (Standard), δείγμα ελέγχου (Control) και δείγμα πλάσματος, στις αντίστοιχες θέσεις της πλάκας εκχύλισης (extraction plate).
- Προσθήκη 500μl από το διάλυμα εκχύλισης (extraction buffer) σε κάθε θέση.
- Προσθήκη 100μl από το διάλυμα των προτύπων (standard buffer), στις θέσεις των προτύπων και των δειγμάτων ελέγχου. Το χρώμα γίνεται μοβ.
- Κάλυψη με αυτοκόλλητη ταινία και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου σε τροχιακό αναδευτήρα (600–900rpm).

- Κατά την επώαση μπαίνουν ετικέτες στα σωληνάρια κάθε ανάλυσης (TC, NSB, Vo, STDB-F και τα δείγματα).
- Άδειασμα της πλάκας και απομάκρυνση των υπολειμμάτων σε χαρτί.
- Προσθήκη 2ml dH₂O σε κάθε θέση.
- Κάλυψη με νέα αυτοκόλλητη ταινία και ανάδευση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου σε τροχιακό αναδευτήρα (600–900rpm).
- Άδειασμα της πλάκας και απομάκρυνση των υπολειμμάτων σε χαρτί.
- Προσθήκη 300μl, 0,05M HCl σε κάθε θέση.
- Επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου σε τροχιακό αναδευτήρα (600–900rpm), χωρίς αυτοκόλλητη ταινία.
- Κατά την επώαση, προετοιμάζεται το ενζυμικό διάλυμα (COMT Enzyme Solution), το οποίο δεν πρέπει να παραμείνει πάνω από 15min από την ώρα προετοιμασίας του, ως εξής: διαλύεται το λυοφιλοποιημένο COMT σε 0,5ml δισαπεσταγμένο ύδωρ και αναδεύεται ήπια. Προστίθεται στην συνέχεια 0,5ml από το διάλυμα του συνενζύμου, ακολουθούμενο από 1ml διάλυμα ενζύμου (enzyme buffer). Ο τελικός όγκος είναι 2 ml/φιαλίδιο.

Αδρεναλίνη

- Προσθήκη 50μl από το διάλυμα COMT σε κάθε σωληνάριο (εκτός από το TC)
- Προσθήκη 100μl από το εκχύλισμα προτύπων, δείγματα ελέγχου και άγνωστων στα αντίστοιχα σωληνάρια
- Προσθήκη 100μl 0,05M HCl στα NSB
- Κάλυψη και ανάδευση σε vortex
- Επώαση για 1h στους 37°C
- Στην διάρκεια της επώασης γίνεται ανασύσταση του ιχνηθέτη και του αντισώματος
- Προσθήκη 50μl ιχνηθέτη αδρεναλίνης
- Προσθήκη 50μl αντισώματος αδρεναλίνης (εκτός από TC και NSB)
- Ανάδευση σε vortex
- Κάλυψη και επώαση 15–20h (overnight) στους 2–8 °C

Νοραδρεναλίνη

- Προσθήκη 25μl από το διάλυμα COMT σε κάθε σωληνάριο (εκτός από το TC)
- Προσθήκη 25μl από το εκχύλισμα προτύπων, δείγματα ελέγχου και άγνωστων στα αντίστοιχα σωληνάρια
- Προσθήκη 25μl 0,05M HCl στα NSB
- Κάλυψη και ανάδευση σε vortex
- Επώαση για 1h στους 37°C
- Στην διάρκεια της επώασης γίνεται ανασύσταση του ιχνηθέτη και του αντισώματος
- Προσθήκη 50μl ιχνηθέτη νοραδρεναλίνης
- Προσθήκη 50μl αντισώματος νοραδρεναλίνης (εκτός από TC και NSB)
- Ανάδευση σε vortex
- Κάλυψη και επώαση 15–20h (overnight) στους 2–8 °C

Δεύτερη ημέρα

- Ανάδευση του ιζηματογενούς αντισώματος (precipitating antiserum) και προσθήκη 1 ml σε κάθε σωληνάριο (εκτός TC).
- Ανάδευση σε vortex.
- Κάλυψη και επώαση 15min σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C).
- Φυγοκέντρηση για 15min στα 3000g σε που να μην υπερβαίνει την θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C).
- Απόχυση των σωληναρίων (εκτός TC).
- Μέτρηση σε μετρητή γ-ακτινοβολίας για 1 min.

3.4. Προσδιορισμός κορτιζόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στα δείγματα έγινε με ραδιοανοσομετρική μέθοδο, που χρησιμοποιεί τριτιωμένη κορτιζόλη, η οποία εκπέμπει β-ακτινοβολία, σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασίας του Οργανισμού Παγκόσμιας Υγείας (WHO, World Health Organization) (Sufi et al., 1994), το οποίο προσαρμόστηκε στα δεδομένα των φαγκριών (βλέπε αποτελέσματα). Για την αξιολόγηση της τροποποιημένης ραδιοανοσομετρικής μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια αξιολόγησης της ανάκτησης και του παραλληλισμού.

3.5. Προσδιορισμός ηλεκτρολυτών

Ο προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών (K^+ , Na^+), έγινε με φλογοφωτομετρική μέθοδο (Sherwood, Flame Photometer 410). Τα δείγματα αραιώθηκαν 1:800 με διάλυμα Νιτρικού λιθίου, συγκέντρωσης 15mmol/L. Με το ίδιο διάλυμα παρασκευάστηκαν και τα πρότυπα διαλύματα (2,5, 5,0, 7,5 και 10ppm) και το τυφλό (0,0ppm). Αφού ρυθμίστηκε το όργανο με το τυφλό και τα πρότυπα διαλύματα, μετρήθηκαν τα δείγματα, τα οποία στην συνέχεια μετασχηματίστηκαν από ppm (mg/L) σε mmol/L.

3.6. Προσδιορισμός οσμωτικής πίεσης

Ο προσδιορισμός της οσμωτικής πίεσης έγινε με την βοήθεια οσμόμετρου (Osmomat 030D, Gonotech), το οποίο ρυθμίστηκε αρχικά με πρότυπο διάλυμα

χλωριούχου νατρίου, συγκέντρωσης $300\text{mOsm}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Στην συνέχεια, 50ml δείγματος τοποθετούνταν σε erpendorfs και μετρούνταν στο όργανο.

3.7. Προσδιορισμός χρόνου προθρομβίνης (PT)

Για τον προσδιορισμό του PT χρησιμοποιήθηκε πλάσμα που προέκυψε από αίμα με αντιπηκτικό κιτρικό τρι-νάτριο (31,3g/L), σε αναλογία 1:10 (Dacie & Lewis, 1975). Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν εις διπλούν σε γυάλινα σωληνάκια και σε θερμοκρασία δωματίου. Ο χρόνος πήξης μετρήθηκε με χρονόμετρο. Τα δείγματα του πλάσματος μετρήθηκαν αμέσως μετά την φυγοκέντρωση τους.

3.7.1. Παρασκευή αντιδραστηρίου θρομβοπλαστίνης

Για τον προσδιορισμό, είναι απαραίτητο εκχύλισμα εγκεφάλου ψαριών, αφού η μέθοδος είναι ειδο-ειδική (species specific). Το υλικό εγκεφαλικής θρομβοπλαστίνης προετοιμάστηκε σύμφωνα με τους Dacie & Lewis (1975), όπως τροποποιήθηκε από τους Pavlidis et al., 1999. 6 εγκεφαλοι φαγκριού, τεμαχίσθηκαν σε μικρά κομμάτια και αφού εμποτίσθηκαν σε ακετόνη, κονιορτοποιήθηκαν με γουδί και διηθήθηκαν, χρησιμοποιώντας σύστημα διήθησης με κενό και χαρτί φιλτραρίσματος (4,7cm) από μικροΐνες γυαλιού (Whatman International Ltd). Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα τρεις φορές, χρησιμοποιώντας κάθε φορά νέα ακετόνη και χαρτί διήθησης. Το τελευταίο χαρτί διήθησης με το υλικό, τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα κενού. Το τελικό αποξηραμένο υλικό, το οποίο είχε μορφή λευκο-υποκίτρινης σκόνης, διαμοιράστηκε, σε ποσότητες 0,03g, σε γυάλινα σωληνάκια και πωματίστηκε με βαμβάκι. Τα σωληνάκια αυτά τοποθετήθηκαν ξανά στον ξηραντήρα, ο οποίος επανεκεκνώθηκε και παρέμεινε στους 4°C μέχρι την χρήση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, με τον ξηραντήρα να επανεκεκνώνεται κάθε φορά που απομακρύνεται ένα σωληνάριο, η θρομβοπλαστίνη διατηρείται για μήνες (Dacie & Lewis, 1975).

3.7.2. Χρόνος προθρομβίνης με την μέθοδο Quick One-stage

Ο προσδιορισμός του χρόνου προθρομβίνης (PT) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα

με την μέθοδο Quick One-stage. Αρχικά προετοιμάζεται το εκχύλισμα εγκεφάλου, διαλύοντας 0,03g του αποξηραμένου σε σκόνη εγκεφάλου σε 5ml φυσιολογικό ορό (NaCl, 9g/L), το οποίο αφού παραμείνει σε ηρεμία έτσι ώστε να καθιζάνουν τα μεγάλα σωματίδια, το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό (Dacie & Lewis, 1975). Ο προσδιορισμός έγινε σε γυάλινα σωληνάρια 75x12mm, εσωτερικής διαμέτρου 10mm, στα οποία προστέθηκαν, 100μl εκχυλίσματος εγκεφάλου και 100μl χλωριούχο ασβέστιο (0,025M). Στην συνέχεια, προστέθηκαν 100μl πλάσματος και ξεκίνησε η χρονομέτρηση. Το μίγμα αναδεύεται ήπια και το σωληνάριο κλίνει προς την οριζόντια θέση και επαναφέρεται στην κάθετη, καθ' όλη την διάρκεια της παρακολούθησης, μέχρι την έναρξη σχηματισμού θρόμβου. Ο χρόνος που απαιτείται για την έναρξη της δημιουργίας θρόμβου, θεωρείται ως ο χρόνος προθρομβίνης (PT).

3.8. Προσδιορισμός μελανίνης δέρματος

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία δέρματος από δύο περιοχές (ραχιαία και κοιλιακά) της δεξιάς πλευράς του σώματος. Στην συνέχεια, σχεδιάστηκε σε ένα φύλο διαφάνειας η περιφέρεια του κάθε δείγματος, και υπολογίστηκε η επιφάνεια του δείγματος, στο εργαστήριο Φυσιολογίας/Νευροβιολογίας, Βιολογικού τμήματος, Πανεπιστημίου Κρήτης, με τη χρήση του συστήματος ανάλυσης της εικόνας η οποία χρησιμοποιεί το λογισμικό NIH Image for Macintosh v1.60, W. Rasband, NIMH. Τα δείγματα, αμέσως μετά τον σχεδιασμό, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια σπινθηρισμού που περιείχαν 95% αιθανόλη, όπου παρέμειναν μέχρι την επόμενη μέρα, οπότε και πραγματοποιήθηκε η ποσοτική ανάλυση της μελανίνης.

Η ποσοτική ανάλυση της μελανίνης στο δέρμα των ψαριών βασίστηκε στη μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Wilson και Dodd (1973) και Sugimoto (1993a). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, τα δείγματα περνάνε από δύο βασικές επεξεργασίες :

- Απομάκρυνση των δειγμάτων από την αιθανόλη και τοποθέτηση τους σε 1% υδροχλωρικό οξύ (HCl), σε θερμοκρασία 60°C (σε υδατόλουτρο) για 1hr. Αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι η αποασβεστοποίηση των δειγμάτων. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα δείγματα του δέρματος ξεπλένονται επανειλημμένα με απεσταγμένο νερό για να αφαιρεθεί πλήρως το υδροχλωρικό οξύ.
- Εκχύλιση των δειγμάτων σε 0.2% καυστικό νάτριο (NaOH) σε θερμοκρασία βρασμού για 1 hr. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φιλτράρεται για να αφαιρεθούν τα μη διαλυμένα αιωρούμενα συστατικά για να μην επηρεάζεται η τιμή της απορρόφησης από αυτά.
- Φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 340 nm.

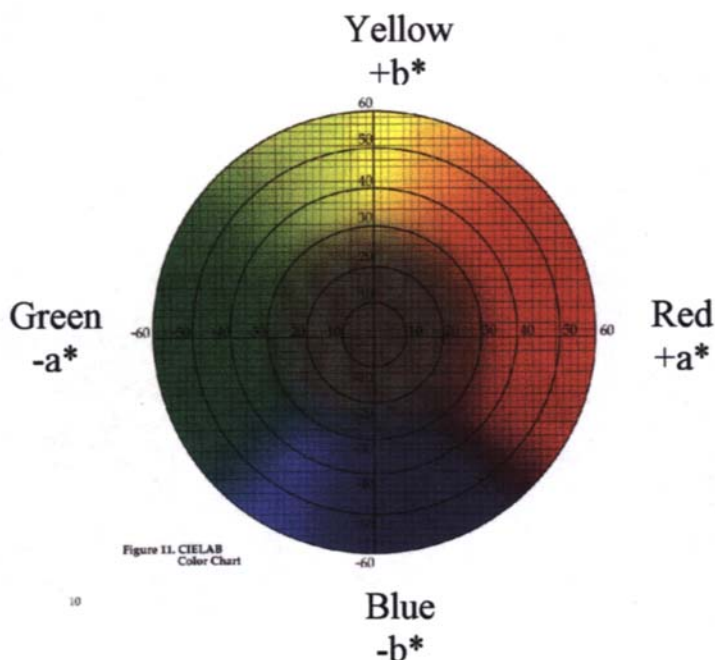
Η τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται για κάθε δείγμα, συγκρίνεται με την τιμή απορρόφησης ενός πρότυπου διαλύματος γνωστής σύστασης και συγκέντρωσης, το οποίο περιέχει 1 ml καθαρής μελανίνης, προερχόμενη από *Sepia officinalis* (SIGMA, M-2649), και 4 ml διαλύματος της ακόλουθης

σύνταξης: 0.4 gr NaOH, 10 ml H₂O και 10 μl H₂O₂ 3%. Για την διάλυση της μελανίνης, το διάλυμα παρέμενε για 20' σε υδατόλουτρο.

3.9. Προσδιορισμός χρώματος δέρματος

Η μέτρηση του χρώματος του δέρματος έγινε σε δύο περιοχές πάνω στο σώμα του ζώου (πάνω και κάτω από την πλευρική γραμμή) με την χρήση φορητού φασματοφωτόμετρου (Tristimulus colormeter, HunterLab MiniScan^{MX} XE). Πριν από κάθε δειγματοληψία το όργανο ρυθμιζόταν με πρότυπα λευκά και μαύρα πλακίδια (Standards).

Το MiniScan λειτουργεί ως εξής: μετράει το χρώμα μιας επιφάνειας αντιλαμβανόμενο την αντανάκλαση τριπλού φωτεινού ερεθίσματος που εκπέμπει το ίδιο πάνω στην προς μέτρηση περιοχή. Η μέθοδος για την χρωματομέτρηση βασίζεται στο σύστημα L^* , a^* , b^* , που προτείνεται από την CIE (International Commission on Illumination, 1976). Το σύστημα αυτό μετατρέπει την πληροφορία για το φάσμα των αντιλαμβανόμενων χρωμάτων σε τρεις παραμέτρους: L^* που αντιστοιχεί στην φωτεινότητα (lightness), a^* για τον κόκκινο και πράσινο χρωματισμό και b^* για τον κίτρινο και μπλε χρωματισμό (Hunter, 1987, Smith et al., 1991, Nickell and Bromage, 1998).



Στο σχήμα φαίνονται οι τιμές των a^* και b^* και τα αντίστοιχα χρώματα που παίρνουν.

Οι τιμές του παράγοντα L^* κινούνται κάθετα στο κέντρο του παραπάνω διαγράμματος κυμαινόμενες μεταξύ του 100, στην κορυφή (για καθαρό λευκό) και του 0 στον πυθμένα (για καθαρό μαύρο). Το μαύρο και το λευκό χρώμα,

μαζί με το γκριζο (στο κέντρο) καλούνται «ουδέτερα» χρώματα, δηλαδή δεν έχουν Hue (H^*). Ο παράγοντας H^* , σχετίζεται με το βασικό χρώμα ενός αντικειμένου όπως είναι το πράσινο ή κόκκινο. Είναι το πρώτο κριτήριο για την διάκριση του χρώματος. Το H^* υπολογίζεται από a^* και b^* ως τοξοεφαπτομένη (arctangent) του λόγου b^*/a^* , δηλαδή:

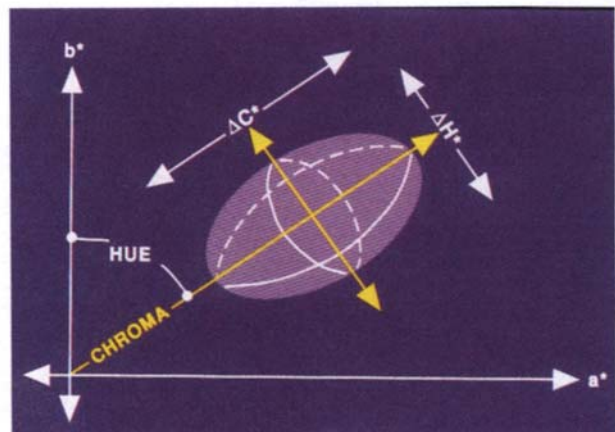
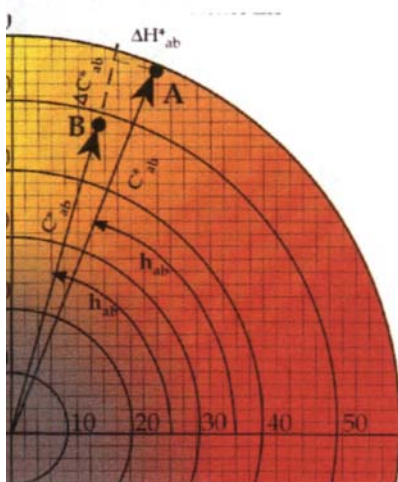
$$H^*_{ab} = \arctan (b^*/a^*).$$

Η παράμετρος H^* περιφέρετε γύρω από τους άξονες του a^*, b^* διαγράμματος ξεκινώντας από 0° δηλαδή $a^* = b^* = 0$.

Οι τιμές του a^* κυμαίνονται από +60 (αντιστοιχεί στο κόκκινο) έως -60 (πράσινο χρωματισμό) και της παραμέτρου b^* από +60 (κίτρινο) έως -60 (μπλε).

Τέλος η χρωματική παράμετρος C^* (*Chroma*) εκφράζει την απόχρωση ή τον κορεσμό ενός χρώματος. Το *Chroma* είναι ο βαθμός πρόσμιξης του καθεαυτού χρώματος με ουδέτερα (γκρι, λευκό) και εκφράζει τελικά τον χρωματικό τόνο δηλαδή την απόχρωση. Χρώματα με χαμηλό C^* χαρακτηρίζονται ως «θολά ή ξεθωριασμένα», ενώ αυτά με υψηλό χαρακτηρίζονται «γεμάτα». Ο παράγοντας C^* υπολογίζεται επίσης από τους παράγοντες a^* και b^* από την εξής εξίσωση:

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}.$$



Στο σχήμα φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού και η θέση των L^*, H^* και C^* στο προηγούμενο διάγραμμα.

4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific).

Η Μηδενική υπόθεση για την οποία ελέγχθηκαν τα δείγματα ήταν η ισότητα των μέσων τιμών των πληθυσμών των δειγμάτων: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$. Όπου k είναι ο αριθμός των πληθυσμών που ελέγχουμε κάθε φορά.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (Normality Test) και την ισότητα των διασπορών τους (Equal Variance Test) και σε περίπτωση που ήταν απαραίτητο εφαρμόστηκε μετασχηματισμός των τιμών σε λογαριθμικές (\log_{10}). Το επόμενο βήμα, αφού πληρούνταν οι ανωτέρω προϋποθέσεις, ήταν ο έλεγχος με t -test, όταν επρόκειτο για δύο πειραματικές ομάδες και με Ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (One-Way Analysis of Variance, ANOVA), όταν επρόκειτο για περισσότερες από δύο πειραματικές ομάδες. Σε περίπτωση που δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις της κανονικότητας και της ισότητας των διασπορών των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικά τεστ (Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis).

Στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($P < 0,05$), χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα Tuckey's ή Dunnett's ή Dunn's τεστ πολλαπλής σύγκρισης (multiple comparison Tests (all pairwise)) για να αναγνωρίσουμε ποιες συγκεκριμένες ομάδες τιμών διέφεραν στατιστικά σημαντικά.

Τέλος για τον έλεγχο του βαθμού συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών που προσδιορίστηκαν χρησιμοποιήθηκε το τεστ πολλαπλής συσχέτισης κατά Pearson (Pearson Product Moment Correlation).



Προσδιορισμός Κορτιζόλης

Πρωτόκολλο προσδιορισμού κορτιζόλης

Εισαγωγή

Η μέθοδος προσδιορισμού είναι σχεδιασμένη για την μέτρηση της κορτιζόλης σε ορό ή πλάσμα ιχθύων του θαλασσινού νερού. Είναι ραδιοανοσολογική (RIA) που χρησιμοποιεί ιχνηθέτη τριτιωμένη κορτιζόλη και Δεξτράνη-Ενεργό άνθρακα για τον διαχωρισμό της ελεύθερης από τη συνδεδεμένη με αντίσωμα ορμόνης.

Λήψη και συντήρηση δειγμάτων

Στον προσδιορισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορός ή πλάσμα (EDTA) αίματος. Ο απαιτούμενος όγκος είναι 50 μl για κάθε δείγμα (εις διπλούν: 100μl). Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C και πριν την ανάλυση πρέπει να τηθούν και να αναδευτούν προσεκτικά. Δεν πρέπει να μένουν σε υγρή μορφή (εκτός ψυγείου) για πολλές ώρες εκτός αν έχει προστεθεί σε αυτά βακτηριοστατικό.

Αντιδραστήρια

1. Ραδιενεργός ιχνηθέτης κορτιζόλης (Amersham, TRK407). Παραλαμβάνεται σε σφραγισμένες αμπούλες των 9,25 MBq (250 μCi). Αμέσως μετά την παραλαβή, το περιεχόμενο πρέπει να μεταγγιστεί, ΜΕ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΟΧΗ, σε ογκομετρική φιάλη των 25ml. Η αμπούλα πρέπει να ξεπλυθεί με διάλυμα Τολουενίου:Αιθανόλης (9:1 v/v) και τα αποπλύματα να προστεθούν στο περιεχόμενο της ογκομετρικής φιάλης, μέχρι τον τελικό όγκο των 25ml. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη διάλυση/φύλαξη του ραδιενεργού ιχνηθέτη θα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας. Αυτό το αποθεματικό διάλυμα (συγκέντρωσης 370kBq ή 10μCi/ml) τοποθετείται σε σκοτεινό μπουκάλι σφραγισμένο αεροστεγώς και φυλάσσεται στους -20° C. Το διάλυμα δεν πρέπει ΠΟΤΕ να παγώσει. Η σταθερότητα των ιχνηθετών τρίτιου ποικίλει σε κάθε παρτίδα.

2. Αντίσωμα κορτιζόλης (Chemicon international, 262MDL). Το αντίσωμα έναντι της κορτιζόλης παραλαμβάνεται σε υγρή μορφή και διατηρείται για χρόνια στους -20°C .

3. Πρότυπο διάλυμα κορτιζόλης (Sigma H-5885, 53H5957). Η κορτιζόλη παραλαμβάνεται σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Στη συνέχεια παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα με τη διάλυση μικρής ποσότητας σε απόλυτη αιθανόλη ($1\mu\text{g}/\text{ml}$). Το αποθεματικό αυτό διάλυμα, συγκέντρωσης $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (stock solution) φυλάσσεται στους 4°C μέχρι την χρησιμοποίησή του. Όταν χρειαστεί λαμβάνεται ποσότητα $400\mu\text{l}$ και προστίθεται σε $9.600\mu\text{l}$ διαλύματος εργασίας (Buffer S). Αυτό το πρότυπο διάλυμα έχει συγκέντρωση κορτιζόλης $40\text{ ng}/\text{ml}$ και διατηρείται στους 4°C για 2-3 εβδομάδες.

4. Ενεργός άνθρακας (Sigma C-5510, 29F0536). Παραλαμβάνεται σε σφραγισμένες σακούλες. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου ή σε ξηραντήρα (σε εργαστήρια σε υγρά κλίματα) μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

5. Ζελατίνη τελεόστεων, Τύπος A (Sigma G-7041, 122K0660). Παραλαμβάνεται σε σφραγισμένες σακούλες που φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

6. Δεξτράνη (Sigma D-1537, 116H0280). Παραλαμβάνεται σε σφραγισμένα μπουκάλια που φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

7. Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S. Για την παρασκευή 500ml διαλύματος αναμιγνύονται τα κάτωθι συστατικά:

- $1,35\text{gr}$ φωσφορικό διυδροξύ-μονονάτριο $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MB 138, Merk, A239846 035)
- $14,63\text{gr}$ φωσφορικό υδροξύ-δινάτριο $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MB 358, Merk, K91148873 934)
- $4,4\text{gr}$ χλωριούχο νάτριο (NaCl , (Merk, K32104204 324))
- $0,05\text{gr}$ Νιτρικό αζίδιο, (Sigma, 122K0660)
- $0,5\text{gr}$ ζελατίνη, (Sigma, K20741188 416)

Όλα τα συστατικά εκτός από τη ζελατίνη διαλύονται σε 400ml απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Η ζελατίνη πρέπει να διαλυθεί σε μικρό όγκο ζεστού νερού (όχι σε βρασμό) πριν να προστεθεί στα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Στη συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O μέχρι τα 0,5L. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι μεταξύ 7,2 και 7,4. Αν το pH χρειάζεται ρύθμιση, αυτή μπορεί να γίνει με προσθήκη σταγόνων υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή υδροχλωρικού οξέος (HCl). Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του pH κανένα από τα παραπάνω άλατα φωσφορικού νατρίου. Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται στους 4 °C για 1 μήνα και χρησιμοποιείται σαν διαλύτης για όλα τα αντιδραστήρια της μεθόδου.

8. Υγρό σπινθηρισμού (scintillation cocktail). Παρασκευάζεται τουλάχιστον 1 μέρα πριν τη χρήση του έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η καλή διάλυση και ανάμιξη των επί μέρους συστατικών του. Για την παρασκευή του σε 2,5L τολουενίου προστίθενται:

- 12,5 gr 2,5-διφαινυλοξαζόλης (PPO, Sigma, 043K1390),
- 0,75 gr p-δισ[2-(5-φαινυλοξαζολυλ)]-βενζόλιο (POPOP, Sigma, 072K0995),
και
- 250 ml 1-οκτανόλης (Merk, K30982091 302)

Το υγρό αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Ιχνηθέτης. Πριν τη χρήση λαμβάνονται 150ml από το αποθεματικό διάλυμα, τοποθετούνται σε γυάλινο σωληνάριο και εξατμίζονται με αέριο άζωτο. Στη συνέχεια γίνεται επανασύσταση με 15ml από το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S. Ο όγκος αυτός αρκεί για ένα προσδιορισμό (assay) των 100 σωληναρίων και περιέχει 3,7KBq/ml (100nCi/ml). Το διάλυμα αυτό δεν φυλάσσεται - τυχόν περίσσεια απορρίπτεται στο τέλος του προσδιορισμού.

Αντίσωμα. Πριν τη χρήση γίνεται αραιώση 1:1.600 με το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S (10 ml αντίσωματος σε 16 ml Buffer S).

Αντιδραστήριο Δεξτράνης-άνθρακα. Σε 100ml ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S διαλύονται 0,0625g Δεξτράνης και στην συνέχεια προστίθενται 0,625g ενεργού άνθρακα. Το διάλυμα αναδεύεται έντονα για 30 sec και φυλάσσεται στους 4° C. Παραμένει σταθερό για 1 μήνα. Πριν την χρήση χρειάζεται έντονη ανάδευση.

Δείγματα. Σε όλα τα δείγματα γίνεται αραιώση 1:10 με απεσταγμένο νερό.

Πρότυπα διαλύματα. Από το αποθεματικό διάλυμα (1μg/ml), παρασκευάζεται το πρώτο πρότυπο διάλυμα κορτιζόλης με συγκέντρωση 40 ng/ml, αραιώνοντας ποσότητα 400 μl σε 9.600 μl ρυθμιστικού διαλύματος buffer S. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις έτσι ώστε να παρασκευαστούν και τα υπόλοιπα πρότυπα διαλύματα, τα οποία έχουν συγκεντρώσεις υποδιπλάσιες του προηγούμενου, δηλαδή 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 ng/ml αντίστοιχα. Αν γίνεται προσδιορισμός περισσότερων από 100 σωληναρίων, πρέπει να υπάρχει ένα σετ με πρότυπα διαλύματα και διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (controls) ανά 100 σωληνάρια. Τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου (controls) χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της απόδοσης του προσδιορισμού.

Διαδικασία προσδιορισμού.

Ένας προσδιορισμός 100 σωληναρίων πρέπει να έχει την εξής διάρθρωση:

Σωληνάρια 1-2	Ολικές κρούσεις (Total counts, TC)
Σωληνάρια 3-4	Μη ειδική δέσμευση (Non specific binding, NSB)
Σωληνάρια 5-6, 49-50, 99-100	Πρότυπο μηδέν (Zero standard, B0)
Σωληνάρια 7-20	Πρότυπα διαλύματα (Standards, Std)
Σωληνάρια 21-98	Άγνωστα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου δυο σετ δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (controls, Cont), ένα στην αρχή, ένα στη μέση και ένα στο τέλος του προσδιορισμού.

Πίνακας 1.1.1. Περιεχόμενα προσδιορισμού κορτιζόλης.

Τα αντιδραστήρια προστίθενται στα σωληνάκια ως εξής:

Ολικές κρούσεις: 100μl από το διάλυμα εργασίας ^3H κορτιζόλης και 800μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer S. Σε αυτά τα σωληνάκια δεν προστίθεται αντιδραστήριο άνθρακα. Τη στιγμή του διαχωρισμού με άνθρακα, τα περιεχόμενα αυτών των σωληναρίων μεταφέρονται κατευθείαν στα σωληνάκια μέτρησης. Αυτά δίνουν την πλήρη ραδιενέργεια που προστίθεται στα σωληνάκια προσδιορισμού. Το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S επιτρέπει τον ίδιο βαθμό απόσβεσης (quenching) με τα άλλα σωληνάκια του προσδιορισμού.

Μη ειδική δέσμευση: 100μl από το διάλυμα εργασίας ^3H κορτιζόλης και 600μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer S. Τα σωληνάκια αυτά διαχωρίζονται κανονικά στο τέλος του προσδιορισμού.

Πρότυπο μηδέν: 100μl από το διάλυμα εργασίας ^3H κορτιζόλης
100μl αντίσωμα
500μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer S)

Πρότυπα και άγνωστα δείγματα: 100μl πρότυπο ή άγνωστο δείγμα
100μl από το διάλυμα εργασίας ^3H κορτιζόλης
100μl αντίσωμα
450μl ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer S).

Προετοιμασία δειγμάτων (τήξη, σήμανση σωληναρίων και αρραίωση)



Προετοιμασία προτύπων
(40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/ml)



Προετοιμασία ιχνηθέτη (3[H]-κορτιζόλη) και αντισώματος



Διαμοίραση δειγμάτων και προτύπων στα σωληνάρια προσδιορισμού



Προσθήκη ιχνηθέτη και αντισώματος



Επώαση στους 4°C overnight



Προσθήκη ενεργού άνθρακα



Επώαση στους 4°C για 30 min



Φυγοκέντρηση δειγμάτων (1000g) για 5 min



Συλλογή υπερκείμενου και προσθήκη στα σωληνάρια μέτρησης



Προσθήκη υγρού σπινθηρισμού και επώαση overnight



Μέτρηση κρούσεων σε β-counter για 1 min



Υπολογισμός συγκεντρώσεων

Διάγραμμα 1.1.1. Διάγραμμα ροής της διαδικασίας προσδιορισμού της κορτιζόλης σε θαλάσσιους ιχθύς.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σωληνάριο	Buffer S	Πρότυπα ή δείγμα	³ H κορτιζόλη,	Αντίσωμα	Ενεργός άνθρακας
TC	800 μl	-	100 μl	-	Επώαση -
NSB	600 μl	-	100 μl	-	στους 4° C 200 μl
BO	500 μl	-	100 μl	100 μl	για 18 h 200 μl
Πρότυπο ή δείγμα	450 μl	50 μl	100 μl	100 μl	200 μl

Πίνακας 1.1.2. Περιεχόμενα σωληναρίων κατά τον προσδιορισμό της κορτιζόλης στους θαλάσσιους ιχθύς.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ

1. Προσθήκη 200 μl ενεργού άνθρακα σε κάθε σωληνάριο
2. Έντονη ανάδευση (Vortex)
3. Ηρεμία για 30 min στους 4° C
4. Φυγοκέντρηση 500 g για τουλάχιστον 5 min (Kubota 5800)
5. Αποχωρισμός του υπερκειμένου προσεκτικά στα σωληνάριο μέτρησης (scintillation vials), αμέσως μετά την φυγοκέντρηση.

Προσοχή:

- Τα σωληνάριο διατηρούνται στους 4° C
- Το αντιδραστήριο ενεργού άνθρακα διατηρείται σε ανάδευση κατά την διάρκεια της προσθήκης στα σωληνάριο
- Το αντιδραστήριο ενεργού άνθρακα πρέπει να προστίθεται γρήγορα στα σωληνάριο ώστε να μην υπάρχει σημαντική διαφορά στο χρόνο επώασης των σωληναρίων. Προτείνεται η χρήση επαναλαμβανόμενης πιπέτας.

Μέτρηση

Προσθήκη 4 ml υγρού σπινθηρισμού σε κάθε σωληνάριο μέτρησης και επώαση overnight. Μέτρηση για 1 min σε μετρητή β-ακτινοβολίας (Beckman LS1701).

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Καμπύλη προτύπων

Υπολογίζεται η αναλογία συνδεδεμένης κορτιζόλης/ιχνηθέτη, αφαιρώντας τη μη ειδική δέσμευση (NSB), $[(B - NSB)/(B_0 - NSB) * 100]$, για όλα τα πρότυπα διαλύματα, τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου (controls) και τα άγνωστα δείγματα. Οι τιμές αυτές δημιουργούν μια μη γραμμική καμπύλη προτύπων. Για την δημιουργία γραμμικής καμπύλης προτύπων, για τους μαθηματικούς υπολογισμούς, οι παραπάνω τιμές μετασχηματίζονται σε LOGIT $[\text{LOGIT} = \ln(B/100 - B)]$ και οι συγκεντρώσεις των προτύπων μετασχηματίζονται σε λογαριθμικές (LOG). Στη συνέχεια ακολουθεί ο υπολογισμός του συντελεστή προσδιορισμού της γραμμικής παλινδρόμησης (R^2) και ο υπολογισμός των συντελεστών της (a, b).

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Μετατρέπονται οι κρούσεις σε συγκεντρώσεις (ng/ml) μέσω της καμπύλης προτύπων LOGIT- LOG και του τύπου $x = (y - a)/b$. Όπου x είναι ο λογάριθμος της συγκέντρωσης σε ng/ml, y είναι η τιμή LOGIT, a είναι το σημείο τομής της καμπύλης με το άξονα y και b είναι η κλίση της καμπύλης. Στη συνέχεια από-λογαριθμοποιείται η συγκέντρωση $\log(x)$, υψώνοντας το 10^x και βρίσκεται η συγκέντρωση κορτιζόλης σε ng/ml. Τέλος η τιμή αυτή πολλαπλασιάζεται $\times 10$ (όλα τα άγνωστα δείγματα είχαν αραιωθεί 1:10).

Δείγματα ποιοτικού ελέγχου

Σαν δείγματα ποιοτικού ελέγχου (controls) χρησιμοποιήθηκαν δυο μίγματα ορών (pool) φαγκριού (ένα χαμηλής και ένα υψηλής συγκέντρωσης κορτιζόλης) που είχαν διαμοιραστεί σε 20 διαφορετικά erpendorf έτσι ώστε σε κάθε διαφορετικό προσδιορισμό να αποψύχετε κάθε φορά ένα μόνο ίδιο δείγμα.



Αποτελέσματα

Πείραμα 1

1.1. Ανάπτυξη και αξιολόγηση ραδιοανοσολογικής μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης.

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης, έγινε με επιτυχία μέσω της τροποποίησης του πρωτοκόλλου εργασίας του Οργανισμού Παγκόσμιας Υγείας (WHO, World Health Organization) (Sufi et al., 1994), το οποίο προσαρμόστηκε στα δεδομένα των θαλασσινών ιχθύων. Οι τροποποιήσεις που έλαβαν χώρα έχουν ως εξής: χρησιμοποιήθηκαν ραδιενεργός ιχνηθέτης κορτιζόλης της εταιρίας Amersham (TRK407), αντίσωμα κορτιζόλης της εταιρίας Chemicon international (262MDL), πρότυπο διάλυμα κορτιζόλης, Sigma (H-5885, 53H5957) σε συγκεντρώσεις 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 ng/ml, ενεργός άνθρακας, Sigma (C-5510, 29F0536), ζελατίνη τελεόστεων, Τύπος A, Sigma (G-7041, 122K0660), δεξτράνη, Sigma (D-1537, 116H0280), ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S (όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο προσδιορισμού) και υγρό σπινθηρισμού (scintillation cocktail) (όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο προσδιορισμού). Τα δείγματα δεν υπέστησαν επώαση για 30 λεπτά στους 60°C πριν από την μέτρηση, η αραιώση στο αντίσωμα κορτιζόλης ήταν 1:1.600, ενώ η αραιώση των δειγμάτων ήταν 1:10 και η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ήταν 50μl σε 450 μl ρυθμιστικό διάλυμα Buffer S. Η ποσότητα υγρού σπινθηρισμού που προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο μέτρησης ήταν 4 ml και ακολούθησε επώαση καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας, πριν από την μέτρηση για 1 min σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Η μέθοδος είναι ακριβής και έχει επαναληψιμότητα.

Δοκιμασία ανάκτησης (Recovery)

Η δοκιμασία ανάκτησης είναι ένα από τα κριτήρια αξιολόγησης της ακρίβειας της ραδιοανοσομετρικής μεθόδου. Ακρίβεια θεωρείται ο βαθμός προσέγγισης της πραγματικής τιμής της κορτιζόλης. Δοκιμασία ανάκτησης ονομάζεται η ικανότητα ανάκτησης μιας ποσότητας κορτιζόλης, η οποία προστίθεται σε ένα γνωστής συγκέντρωσης δείγμα. Ως ανάκτηση, ορίζεται ο λόγος της μετρούμενης

συγκέντρωσης της ορμόνης προς τη θεωρητική.

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{\text{Μετρούμενη συγκέντρωση} * 100}{\text{Θεωρητική συγκέντρωση}}$$

Για την δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα τα οποία μετρήθηκαν εις τριπλούν, αφενός μόνα τους και αφετέρου προσθέτοντας σε αυτά δύο αυξανόμενες ποσότητες ιχνηθέτη γνωστής περιεκτικότητας σε κρούσεις, επίσης μετρήθηκαν και οι ποσότητες ιχνηθέτη γνωστών κρούσεων μόνες τους προκειμένου να επιβεβαιωθεί και πρακτικά η θεωρητική περιεκτικότητα τους σε κρούσεις. Οι ποσότητες του ιχνηθέτη που προστέθηκαν στα δείγματα υπολογίσθηκαν έτσι ώστε να μην ξεφεύγουν από τα όρια ανίχνευσης της πρότυπης καμπύλης του προσδιορισμού.

Δείγμα	Προσθήκη 1	Προσθήκη 2
Δείγμα 1	Δείγμα 1+ Προσθήκη 1	Δείγμα 1+ Προσθήκη 2
Δείγμα 2	Δείγμα 2+ Προσθήκη 1	Δείγμα 2+ Προσθήκη 2

Προσθήκη 1=100μl αραιωμένου ιχνηθέτη 1:10 (περιέχει 365 κρούσεις)

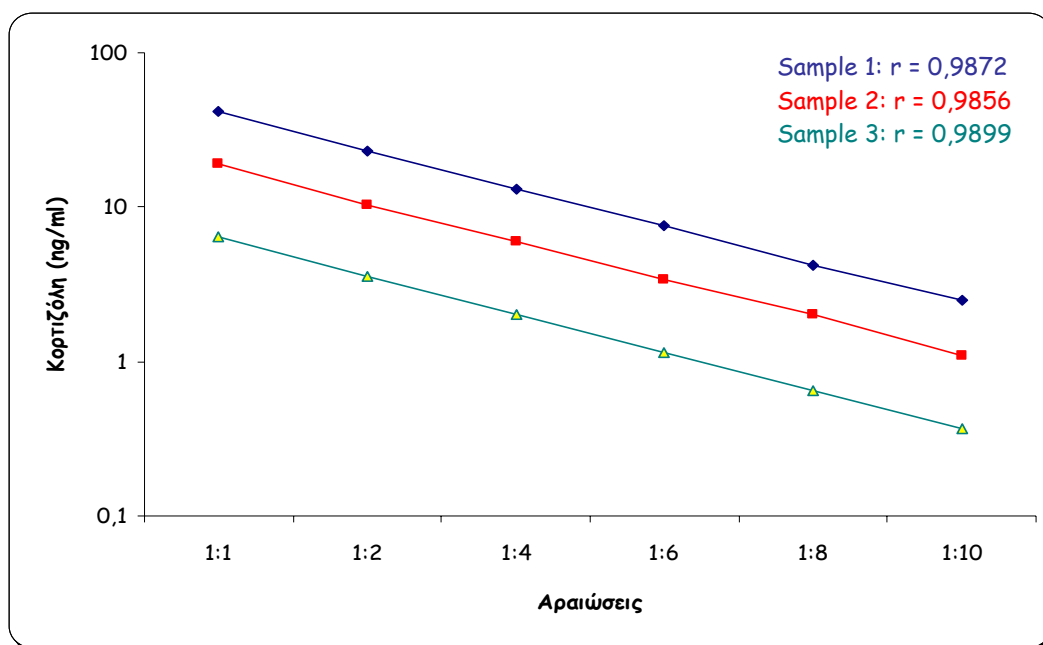
Προσθήκη 2=200μl αραιωμένου ιχνηθέτη 1:10 (περιέχει 730 κρούσεις)

Η ανάκτηση υπολογίσθηκε από τον παραπάνω τύπο $103 \pm 2.5\%$ (mean \pm SD). Αυτό σημαίνει ότι οι τιμές κορτιζόλης που υπολογίζονται από την συγκεκριμένη μέθοδο πιθανόν να είναι ελαφρώς υπερτιμημένες.

Δοκιμασία παραλληλισμού

Μια άλλη μέθοδος εκτίμησης της ακρίβειας του προσδιορισμού είναι η αραιώση. Ορός γνωστής συγκέντρωσης κορτιζόλης αραιώνεται διαδοχικά και σχεδιάζεται η ευθεία παλινδρόμησης μεταξύ των αραιώσεων και των μετρούμενων τιμών. Η προέκταση της ευθείας πρέπει να τέμνει τους άξονες στη μηδενική συγκέντρωση. Αυτό δείχνει απουσία παρεμβολών από το περιβάλλον του ορού.

Για την δοκιμασία του παραλληλισμού χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα ορού και 3 δείγματα πλάσματος (αντιπηκτικό: EDTA), τα οποία αραιώθηκαν διαδοχικά μέχρι την αραιώση 1:10 (Αραιώσεις: 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 και 1:10). Το πλάσμα και ο ορός χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της μεθόδου για την μέτρηση κορτιζόλης σε κάθε ένα από αυτά. Στο διάγραμμα φαίνονται οι καμπύλες των αραιώσεων των 3 δειγμάτων ορού.

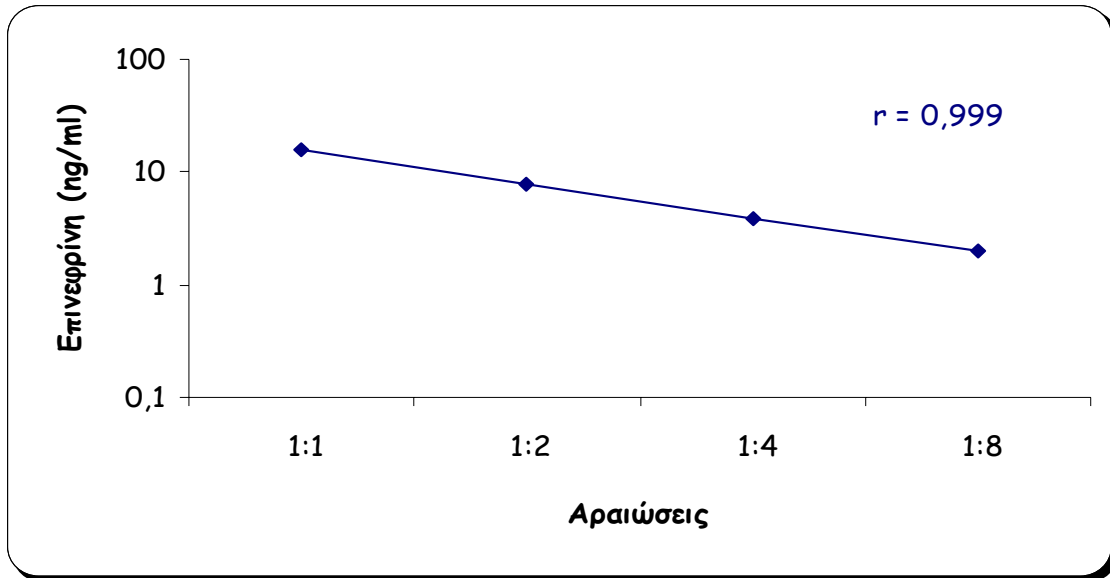


Διάγραμμα 1.1.2. Καμπύλες προσδιορισμού κορτιζόλης των αραιώσεων (1:1 έως 1:10) των 3 δειγμάτων ορού.

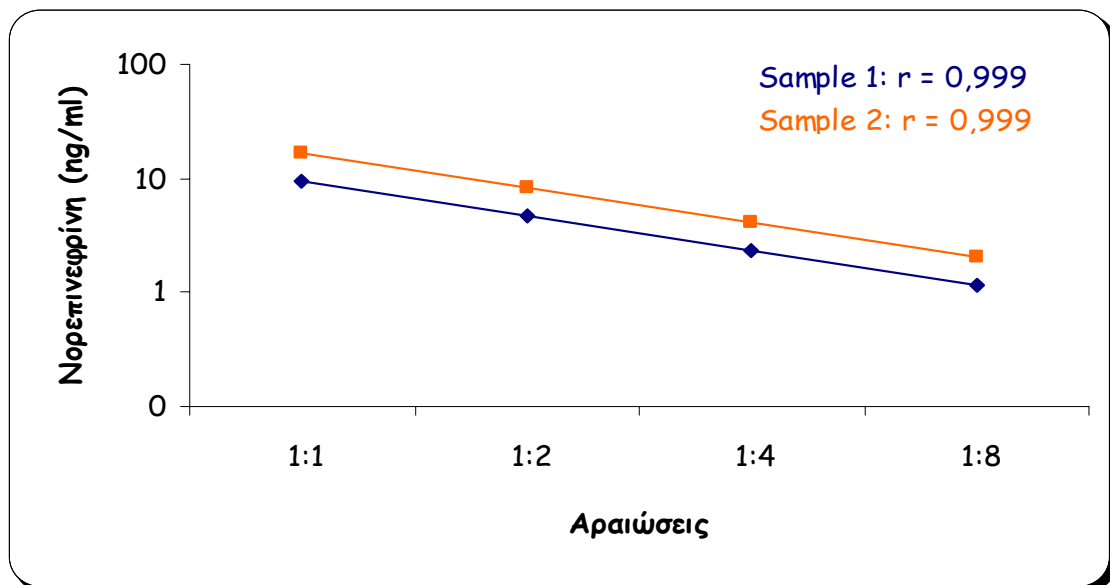
1.2. Αξιολόγηση μεθόδου προσδιορισμού κατεχολαμινών

Δοκιμασία παραλληλισμού

Για την δοκιμασία του παραλληλισμού χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα πλάσματος (αντιπηκτικό: EDTA), τα οποία αραιώθηκαν διαδοχικά μέχρι την αραιώση 1:8 (Αραιώσεις: 1:2, 1:4, 1:8).



Διάγραμμα 1.2.1 Καμπύλη προσδιορισμού Επινεφρίνης των αραιώσεων (1:1 έως 1:8) πλάσματος (EDTA).



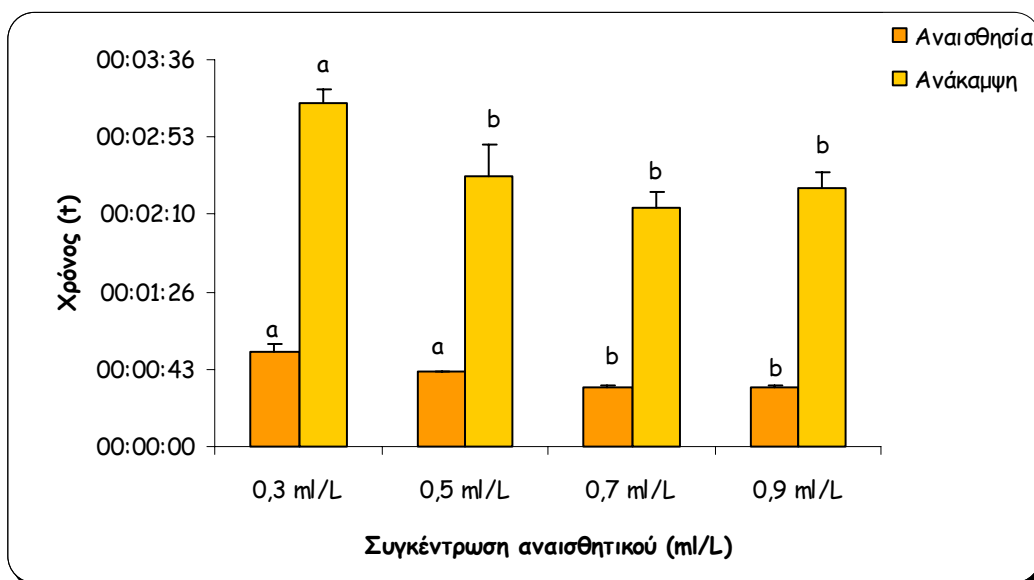
Διάγραμμα 1.2.2 Καμπύλη προσδιορισμού Νορεπινεφρίνης των αραιώσεων (1:1 έως 1:8) 2 δειγμάτων πλάσματος (EDTA).

Πείραμα 2

Αξιολόγηση χρήσης αναισθησίας

2.1. Απόκριση ψαριών στην αναισθησία

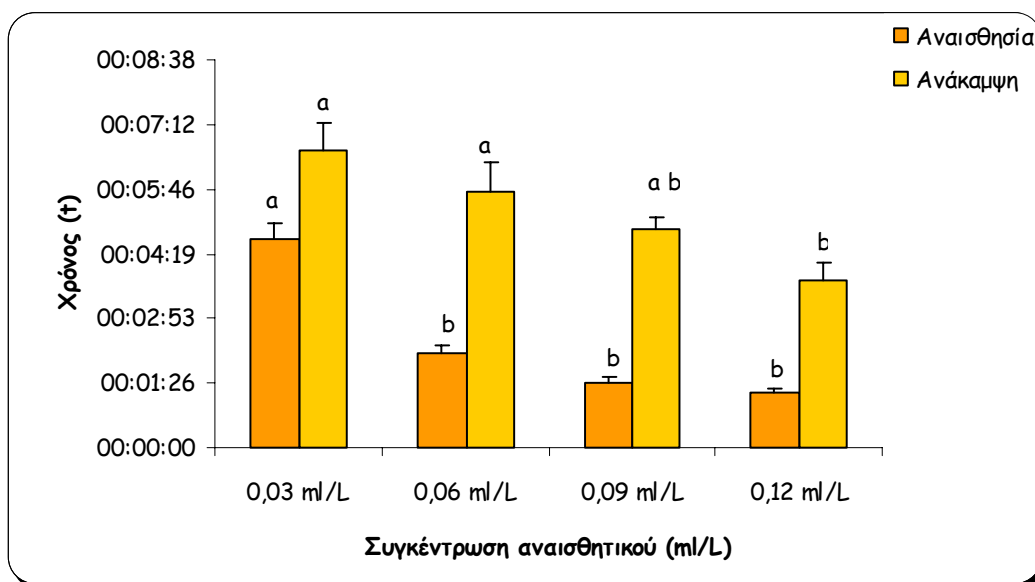
Ο χρόνος (mean±SEM) που απαιτείται για να φτάσουν τα ζώα στο στάδιο χειρουργικής αναισθησίας (Στάδιο 3) και στο στάδιο της ανάκαμψης (αποκατάσταση της κολύμβησης) υπό την επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων 2-φαινοξυαιθανόλης, φαίνονται στον πίνακα 2.1.1. (αναλυτικά οι χρόνοι για κάθε συγκέντρωση φαίνονται στο παράρτημα στο τέλος του κεφαλαίου). Στατιστικά μεγαλύτερος χρόνος επίτευξης αναισθησίας παρατηρείται στις συγκεντρώσεις 0,3 και 0,5ml/L σε σχέση με τις συγκεντρώσεις 0,7 και 0,9ml/L, ενώ στον χρόνο ανάκαμψης μεταξύ της συγκέντρωσης 0,3ml/L με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 2.1.1. Χρόνος που απαιτείται για την αναισθητοποίηση και την ανάκαμψη των ζώων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 2-φαινοξυαιθανόλης. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Οι αντίστοιχοι χρόνοι (mean±SEM) υπό την επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων γαρυφαλέλαιου, φαίνονται στο διάγραμμα 2.1.2. (αναλυτικά οι χρόνοι για κάθε συγκέντρωση φαίνονται στο παράρτημα στο τέλος του

κεφαλαίου). Στατιστικά μεγαλύτερος χρόνος επίτευξης αναισθησίας παρατηρείται στη συγκέντρωση 0,03ml/L σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, ενώ μικρότερος χρόνος ανάκαμψης παρατηρείται στη συγκέντρωση 0,12ml/L σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις 0,03 και 0,06ml/L.



Διάγραμμα 2.1.2. Χρόνος που απαιτείται για την αναισθητοποίηση και την ανάκαμψη των ζώων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γαρυφαλέλαιου. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

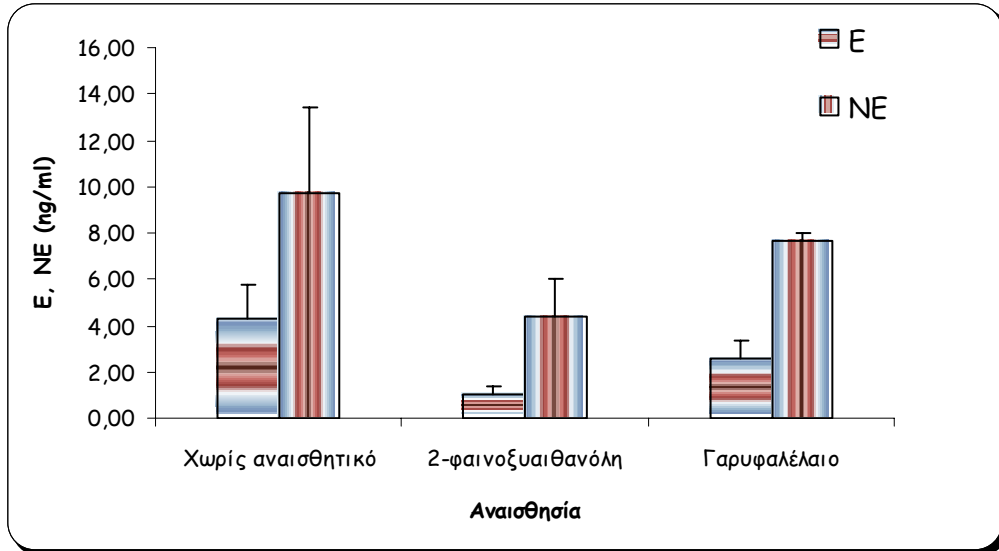
2.2. Αναισθησία και δείκτες καταπόνησης

Λαμβάνοντας υπ' όψη το παραπάνω πείραμα οι συγκεντρώσεις των αναισθητικών που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των δεικτών καταπόνησης ήταν οι 0,35ml/L για την 2-φαινοξυαιθανόλη (συνήθης χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση) και 0,06ml/L για το γαρυφαλέλαιο, στις οποίες τα ψάρια αναισθητοποιούνται σε περίπου ένα και δύο λεπτά αντίστοιχα και ανακάμπτουν σε τρία και έξι λεπτά αντίστοιχα.

Πρωτογενής απόκριση

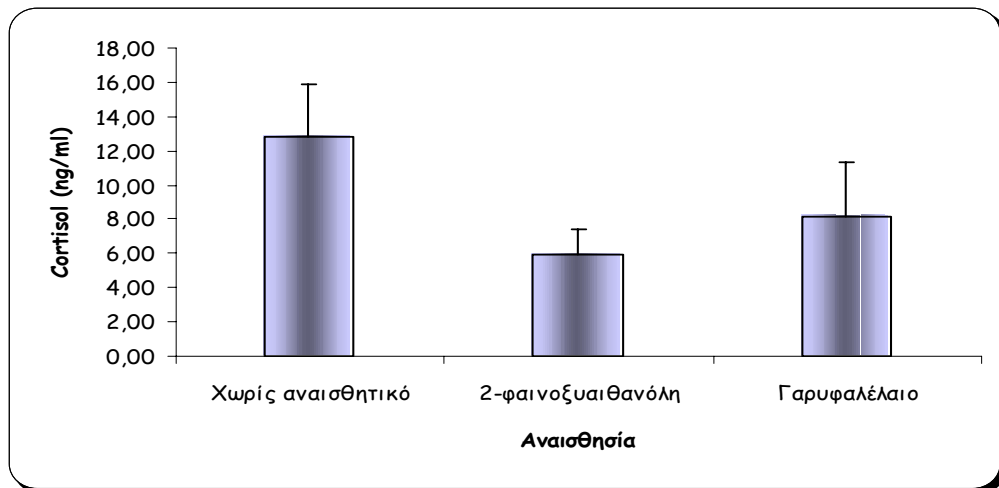
Οι συγκεντρώσεις των κατεχολαμινών (Επινεφρίνη και Νορεπινεφρίνη) στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν αντίστοιχα $4,29 \pm 1,48 \text{ ng/ml}$ και $9,74 \pm 3,68 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SEM) για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, $1,04 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$ και

4,4±1,63ng/ml για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και 2,58±0,8ng/ml και 7,64±0,34ng/ml για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές επίσης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p_E=0,083$ και $p_{NE}=0,363$, $F_E=1,59$ και $F_{NE}=1,10$).



Διάγραμμα 2.2.1. Συγκέντρωση κατεχολαμινών (ng/ml), σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια.

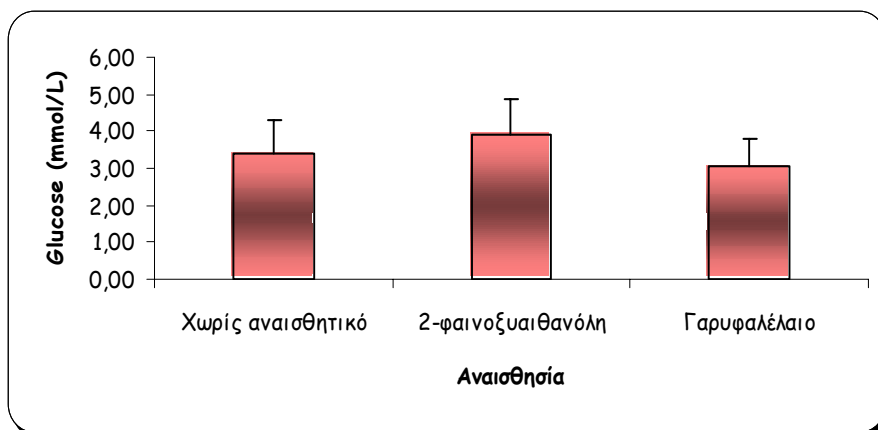
Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στον ορό του αίματος βρέθηκαν 12,76±3,17ng/ml (mean±SEM) για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, 5,93±1,44ng/ml για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και 8,15±3,14ng/ml για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p=0,237$, $F=1,53$).



Διάγραμμα 2.2.2. Συγκέντρωση κορτιζόλης (ng/ml), σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια.

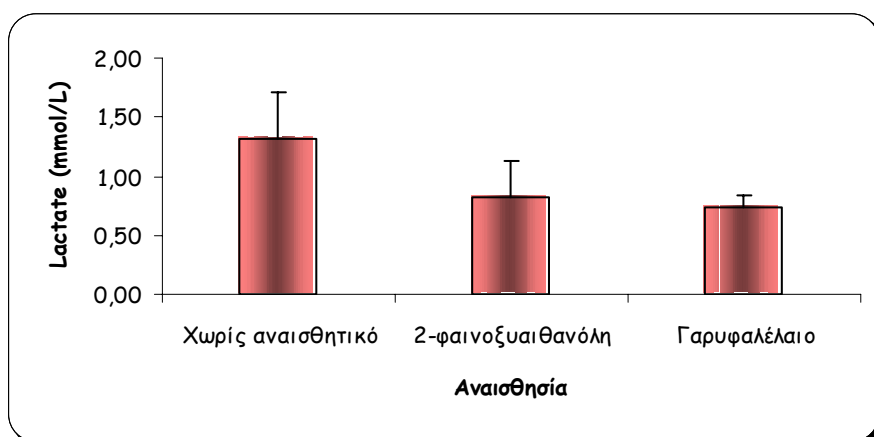
Δευτερογενής απόκριση

Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $3,37 \pm 0,27 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια που δεν υπέστησαν αναισθησία, $3,93 \pm 0,28 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $3,06 \pm 0,21 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p=0,061$, $F=3,05$).



Διάγραμμα 2.2.3. Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol/L), σε αναισθητοποιημένα με τα δύο αναισθητικά και μη ψάρια.

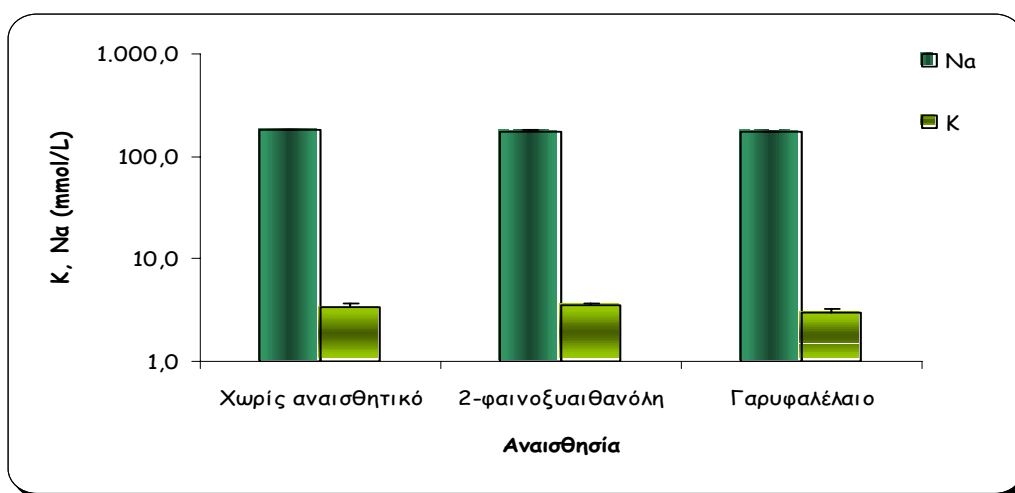
Οι συγκεντρώσεις της γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν αντίστοιχα $1,32 \pm 0,38 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια που δεν υπέστησαν αναισθησία, $0,82 \pm 0,32 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $0,74 \pm 0,09 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές επίσης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p=0,336$, $F=1,39$).



Διάγραμμα 2.2.4. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (mmol/L), σε αναισθητοποιημένα και μη

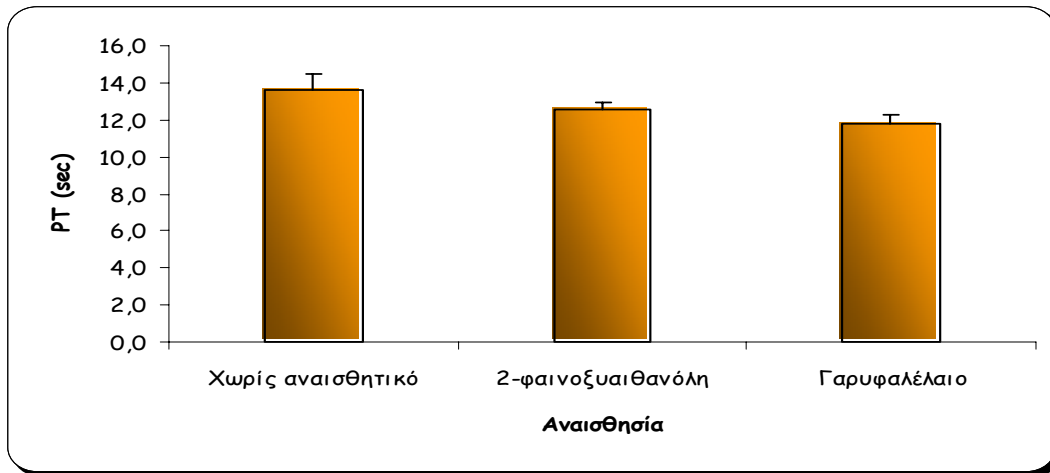
ψάρια.

Οι ηλεκτρολύτες (K, Na) στον ορό του αίματος παρουσίασαν συγκεντρώσεις $3,43 \pm 0,3 \text{ mmol/L}$ και $178,88 \pm 1,67 \text{ mmol/L}$ αντίστοιχα (mean \pm SEM) για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, $3,03 \pm 0,22 \text{ mmol/L}$ και $175,07 \pm 2,46 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $3,49 \pm 0,23 \text{ mmol/L}$ και $177,39 \pm 2,46 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές επίσης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p_K=0,376$ και $p_{Na}=0,508$, $F_K=1,02$ και $F_{Na}=0,70$).



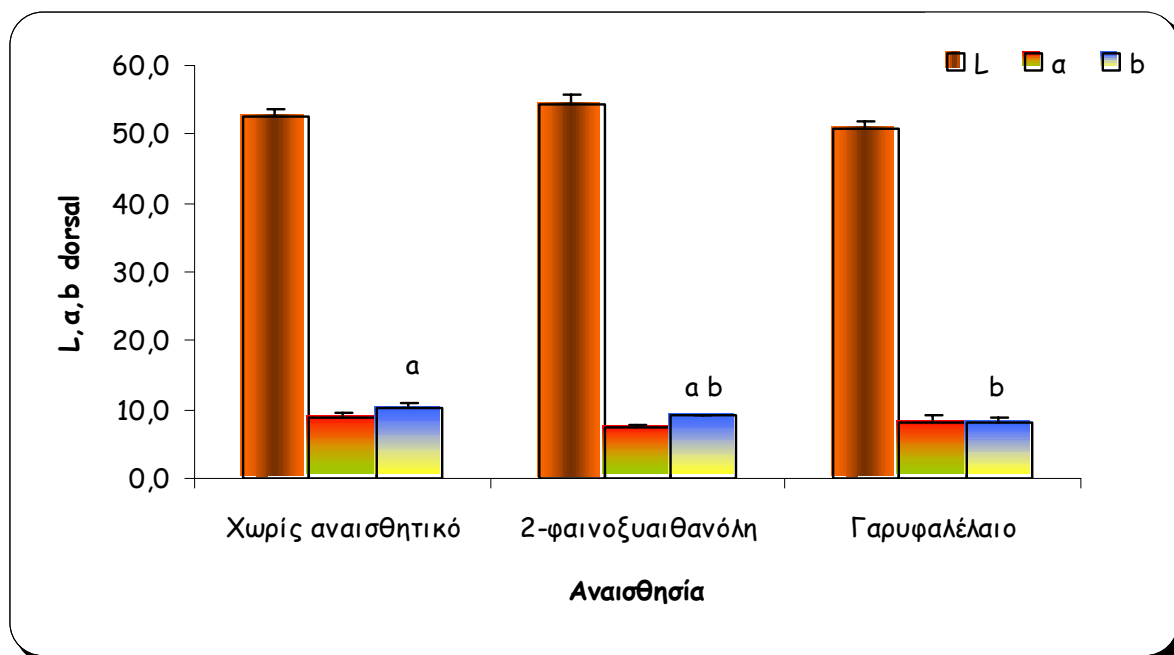
Διάγραμμα 2.2.5. Συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (K, Na) (mmol/L), σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια.

Ο χρόνος προθρομβίνης στο πλάσμα του αίματος βρέθηκε $13,6 \pm 2,9 \text{ sec}$ (mean \pm SEM) για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, $12,51 \pm 1,54 \text{ sec}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $11,78 \pm 1,62 \text{ sec}$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p=0,202$).



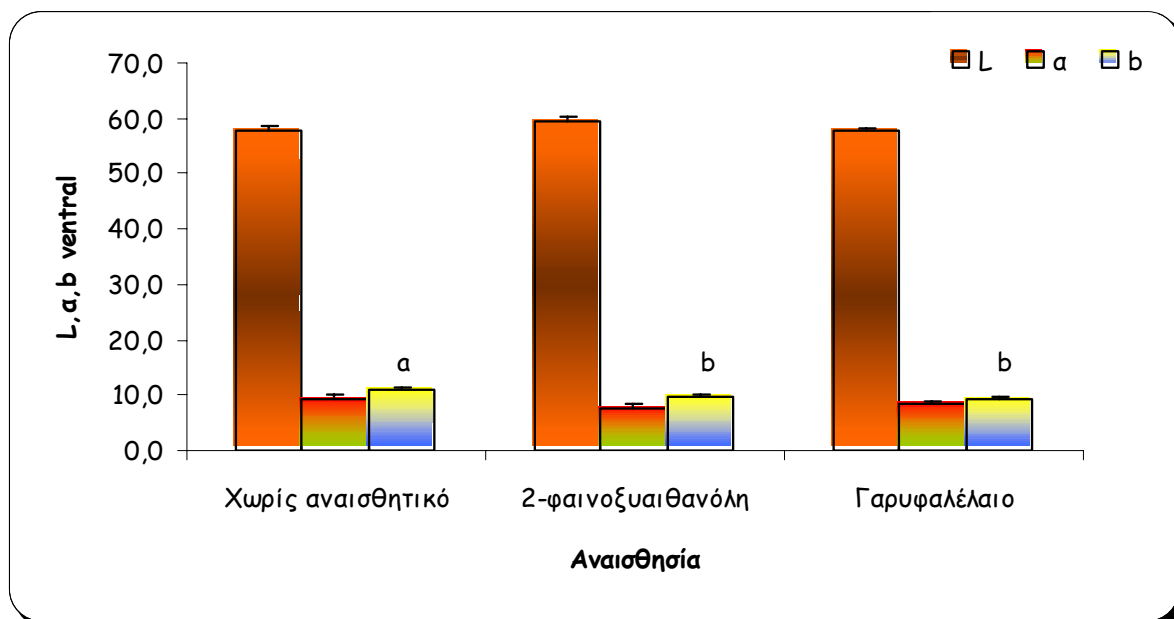
Διάγραμμα 2.2.6. Χρόνος προθρομβίνης (sec), σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια.

Όσον αφορά στο χρώμα του δέρματος (L, α , b) οι τιμές που βρέθηκαν για την **ραχιαία** περιοχή είναι $L=52,63 \pm 1,15$ (mean \pm SEM), $\alpha=8,99 \pm 0,56$ και $b=10,27 \pm 0,51$ για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, $L=54,35 \pm 1,49$ (mean \pm SEM), $\alpha=7,26 \pm 0,59$ και $b=9,01 \pm 0,34$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $L=50,66 \pm 1,24$ (mean \pm SEM), $\alpha=8,2 \pm 0,85$ και $b=8,11 \pm 0,82$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Από τις τιμές αυτές στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους παρουσιάζουν μόνο οι τιμές του b ($p_L=0,295$, $p_\alpha=0,144$, $p_b=0,036$, $F_L=1,27$, $F_\alpha=2,05$, $F_b=3,69$) (Διάγραμμα 2.2.7), όπου τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια έχουν περισσότερο κίτρινο χρωματισμό από αυτά που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο.



Διάγραμμα 2.2.7. Χρώμα δέρματος (L, a, b), στην ραχιαία περιοχή του σώματος σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Για την **κοιλιακή** περιοχή του σώματος οι τιμές που βρέθηκαν είναι $L = 57,83 \pm 0,92$ (mean \pm SEM), $\alpha = 9,46 \pm 0,56$ και $b = 11,07 \pm 0,32$ για τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια, $L = 59,37 \pm 0,77$, $\alpha = 7,79 \pm 0,52$ και $b = 9,61 \pm 0,41$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με 2-φαινοξυαιθανόλη και $L = 57,72 \pm 0,66$, $\alpha = 8,48 \pm 0,52$ και $b = 9,13 \pm 0,42$ για τα ψάρια που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. Από τις τιμές αυτές στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους παρουσιάζουν μόνο οι τιμές του b ($p_L = 0,408$, $p_\alpha = 0,104$, $p_b = 0,003$ $F_L = 0,92$, $F_\alpha = 2,43$, $F_b = 6,88$) (Διάγραμμα 2.2.8), όπου τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια έχουν περισσότερο κίτρινο χρωματισμό από τα αναισθητοποιημένα.



Διάγραμμα 2.2.8. Χρώμα δέρματος (L, a, b), στην κοιλιακή περιοχή του σώματος σε αναισθητοποιημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Τέλος κατά την δοκιμασία βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών που προσδιορίστηκαν, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ:

- α) Κορτιζόλης και Χρόνου προθρομβίνης με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,038$), το οποίο σημαίνει ότι όταν η μία μεταβλητή αυξάνεται η άλλη μειώνεται και το αντίστροφο ($p=0,0232$)
- β) Γλυκόζης και Νορεπινεφρίνης με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,318$), το οποίο σημαίνει ότι οι δύο μεταβλητές αυξάνονται και μειώνονται ανάλογα ($p=0,0227$)
- γ) Νορεπινεφρίνης και Επινεφρίνης με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,54$) ($p=0,00275$).

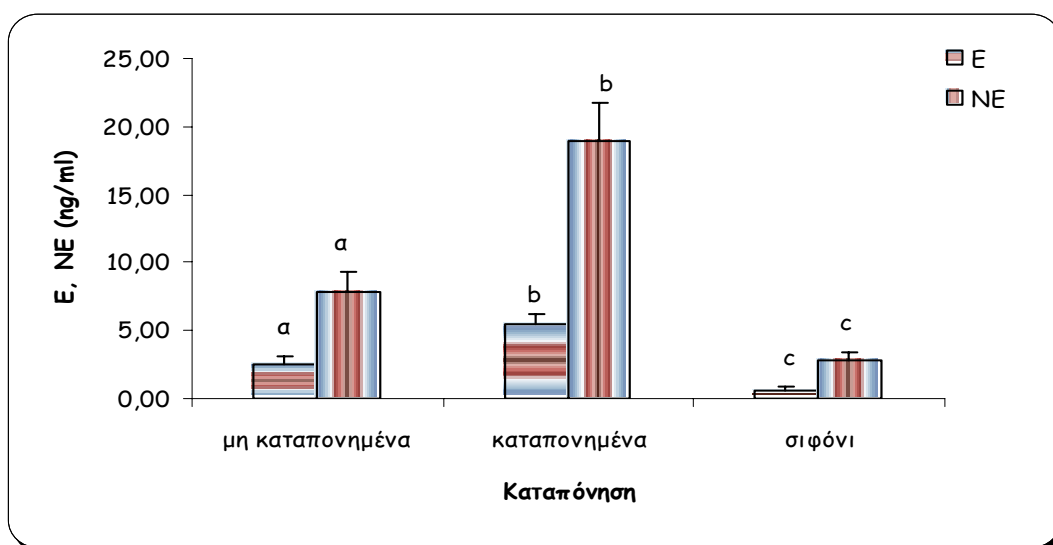
Πείραμα 3

Απόκριση των ψαριών σε οξεία καταπόνηση

3.1. Σύλληψη και έκθεση στον αέρα (συγχρωτισμός)

Πρωτογενής απόκριση

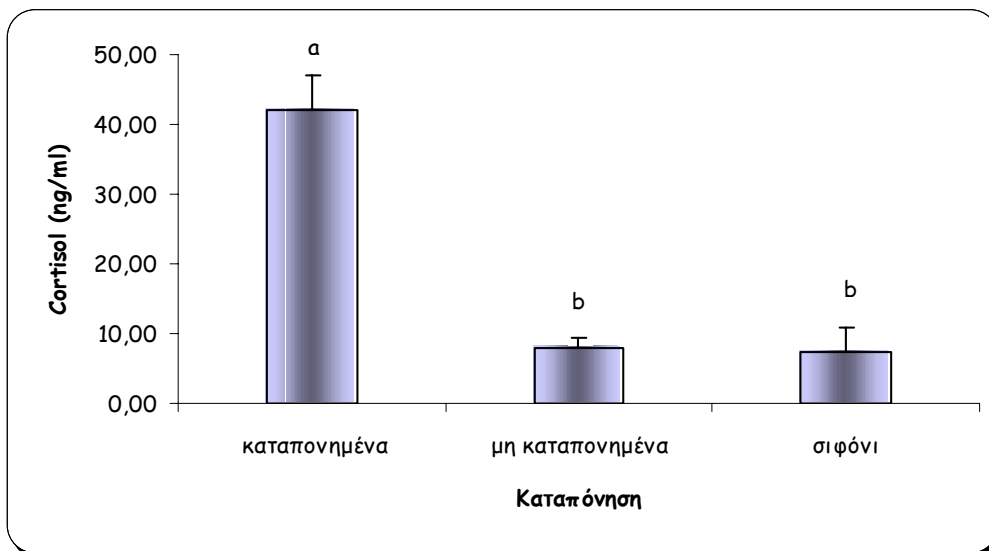
Οι συγκεντρώσεις των κατεχολαμινών (E, NE) στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν $2,52 \pm 0,6 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SEM) και $7,78 \pm 1,56 \text{ ng/ml}$ αντίστοιχα για τα μη καταπονημένα ψάρια, $5,4 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$ και $18,9 \pm 2,8 \text{ ng/ml}$ για τα ψάρια που καταπονήθηκαν και $0,66 \pm 0,16 \text{ ng/ml}$ και $2,77 \pm 0,7 \text{ ng/ml}$ για τα μη καταπονημένα ψάρια, που υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων ($p_{E,NE} < 0,001$, $F_E = 13,42$, $F_{NE} = 14,57$).



Διάγραμμα 3.1.1. Συγκέντρωση κατεχολαμινών (E, NE) σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0,05$).

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $8,03 \pm 1,47 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SEM) για τα μη καταπονημένα ψάρια, $41,96 \pm 5,01 \text{ ng/ml}$ για τα ψάρια που καταπονήθηκαν και $7,39 \pm 3,5 \text{ ng/ml}$ για τα μη καταπονημένα ψάρια, που

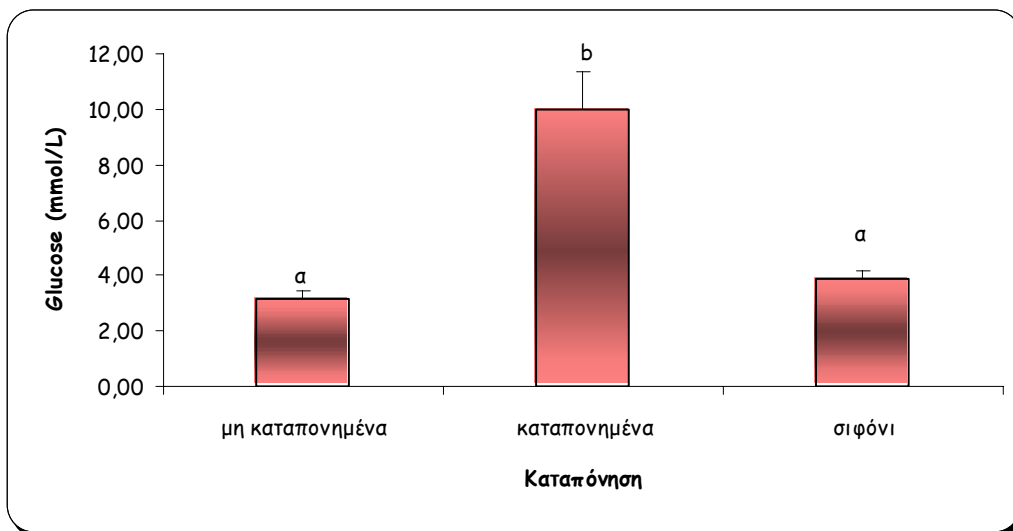
υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταπονημένων ζώων και των άλλων ομάδων ($p < 0,001$, $F = 28,12$).



Διάγραμμα 3.1.2. Συγκέντρωση κορτιζόλης σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0,05$).

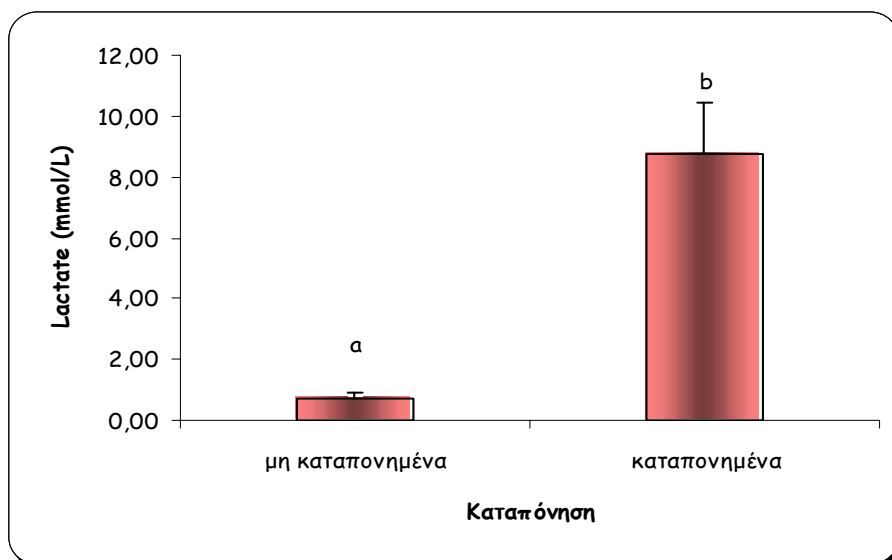
Δευτερογενής απόκριση

Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $3,14 \pm 0,13 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM) για τα μη καταπονημένα ψάρια, $9,97 \pm 1,42 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που καταπονήθηκαν με σύλληψη και έκθεση στον αέρα για 3–4 λεπτά και $3,9 \pm 0,29 \text{ mmol/L}$ για τα μη καταπονημένα ψάρια, που υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι, 10–15 min πριν τη δειγματοληψία. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας των καταπονημένων ψαριών και των άλλων δύο ομάδων ($p < 0,001$ $F = 34,70$).



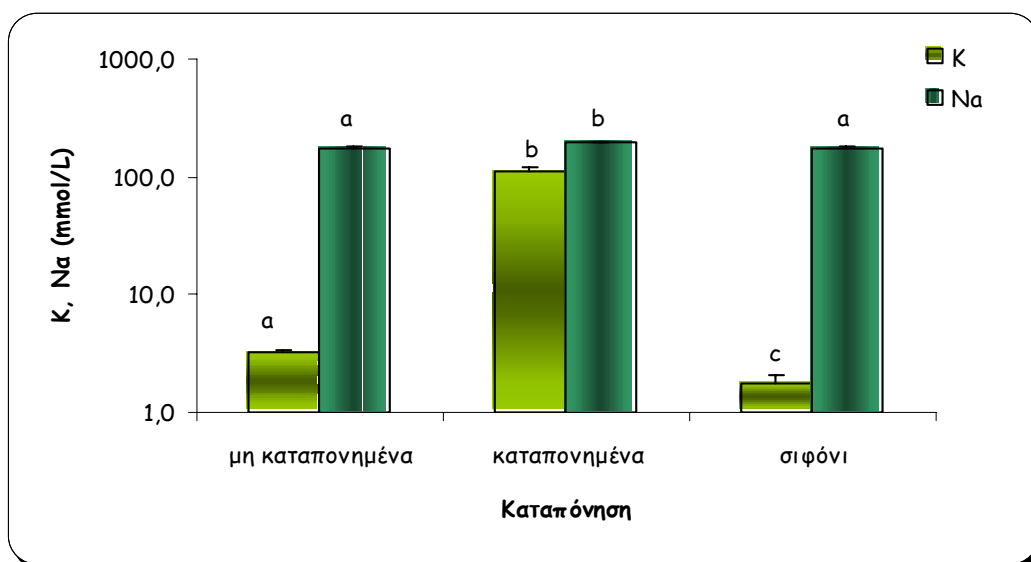
Διάγραμμα 3.1.3. Συγκέντρωση γλυκόζης σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν $0,72 \pm 0,17 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM) για τα μη καταπονημένα ψάρια και $8,78 \pm 1,67 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια που καταπονήθηκαν με σύλληψη και έκθεση στον αέρα. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p = < 0,001$).



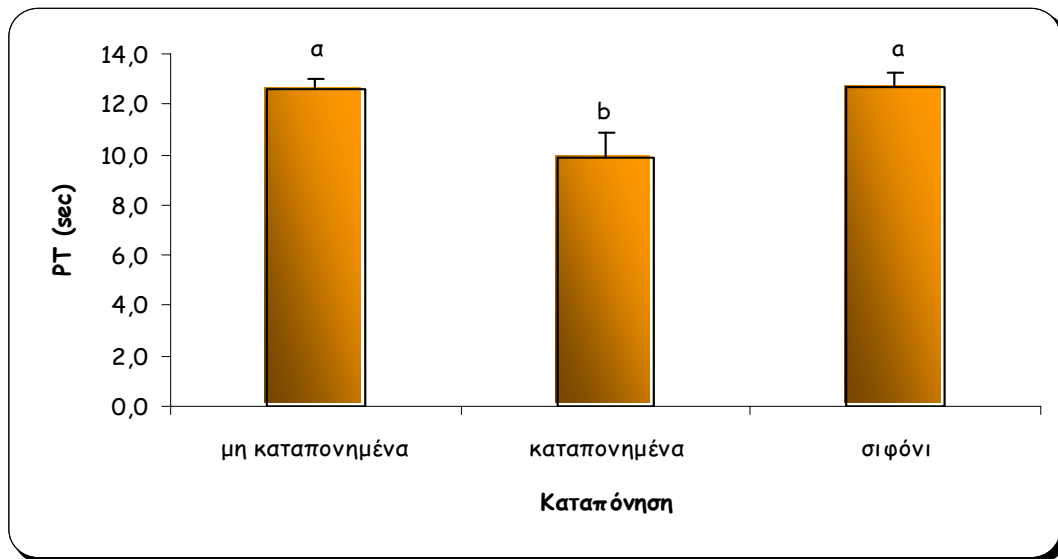
Διάγραμμα 3.1.4. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Οι συγκεντρώσεις των ηλεκτρολυτών (K, Na) στον ορό του αίματος βρέθηκαν $3,31 \pm 0,15$ mmol/L (mean \pm SEM) και $176,96 \pm 1,31$ mmol/L αντίστοιχα, για τα μη καταπονημένα άτομα, $112,92 \pm 6,98$ mmol/L και $194,09 \pm 2,56$ mmol/L για τα ψάρια που καταπονήθηκαν και $1,8 \pm 0,26$ mmol/L και $177,39 \pm 5,22$ mmol/L για τα μη καταπονημένα ψάρια, που υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι πριν τη δειγματοληψία. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Διάγραμμα 3.1.5). Η συγκέντρωση του καλίου διαφέρει μεταξύ όλων των ομάδων, ενώ η συγκέντρωση του νατρίου διαφέρει μεταξύ της ομάδας των καταπονημένων ατόμων και των άλλων ομάδων ($p_{K,NA} < 0,001$, $F_K = 660,82$ $F_{NA} = 15,11$).



Διάγραμμα 3.1.5. Συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (K, Na) σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Ο χρόνος προθρομβίνης στον ορό του αίματος βρέθηκε $12,63 \pm 0,37$ sec (mean \pm SEM) για τα μη καταπονημένα ψάρια, $9,86 \pm 1,03$ sec για τα ψάρια που καταπονήθηκαν και $12,67 \pm 0,58$ sec για τα μη καταπονημένα ψάρια, που υπέστησαν το κατέβασμα του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι πριν τη δειγματοληψία. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας των καταπονημένων ζώων και των άλλων ομάδων ($p = 0,01$, $F = 4,80$).



Διάγραμμα 3.1.6. Χρόνος προθρομβίνης (PT) σε καταπονημένα και μη ψάρια. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

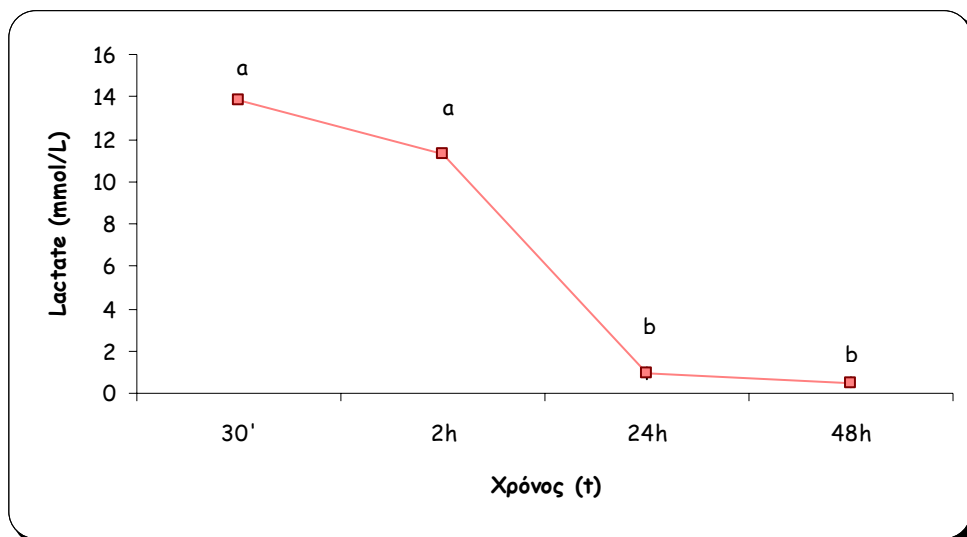
Κατά την δοκιμασία βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών που προσδιορίστηκαν, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ:

- α) Κορτιζόλης και Κατεχολαμινών (E, NE), με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,124$ και $r^2 = 0,183$ αντίστοιχα), το οποίο σημαίνει ότι όταν αυξάνεται η τιμή της μιας μεταβλητής αυξάνεται και η τιμή της άλλης ($p=0,048$ και $0,013$ αντίστοιχα)
- β) Γλυκόζης και Κατεχολαμινών (E, NE), με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,221$ και $r^2 = 0,203$ αντίστοιχα), το οποίο σημαίνει ότι οι δύο μεταβλητές αυξάνονται και μειώνονται ανάλογα ($p=0,03$ και $0,037$ αντίστοιχα)
- γ) Νορεπινεφρίνης και Επινεφρίνης, με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,887$) ($p=3,19 \cdot 10^{-16}$)
- δ) Γλυκόζης και Καλίου, με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,746$) ($p=3,3 \cdot 10^{-6}$)
- ε) Γλυκόζης και Νατρίου, με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,71$) ($p=2,1 \cdot 10^{-5}$)
- ζ) Γλυκόζης και Χρόνου προθρομβίνης, με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,179$) ($p=0,044$)

η) Καλίου και Νατρίου, με συντελεστή συσχέτισης θετικό $r^2 = 0,487$, $p=1,26 \cdot 10^{-5}$).

3.2. Κινητική της απόκρισης σε οξεία καταπόνηση

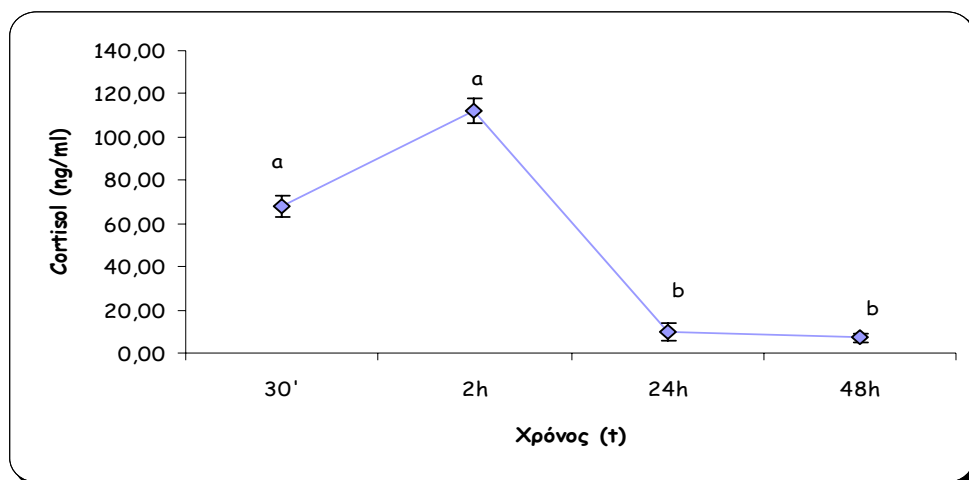
Οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν $13,79 \pm 0,09 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM), 30min μετά από το επεισόδιο καταπόνησης, $11,32 \pm 0,14 \text{ mmol/L}$ στις 2h μετά, $0,92 \pm 0,42 \text{ mmol/L}$ στις 24h μετά και $0,51 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$ στις 48h μετά από το επεισόδιο καταπόνησης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ των τιμών των δύο πρώτων ωρών και των τιμών μετά το εικοσιτετράωρο (Διάγραμμα 3.2.1) ($p < 0,001$).



Διάγραμμα 3.2.1. Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 30 min, 2h, 24h και 48h μετά από έκθεση των ψαριών σε οξεία καταπόνηση. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0,05$).

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $68,14 \pm 4,73 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SEM), 30min μετά από το επεισόδιο καταπόνησης, $111,92 \pm 5,58 \text{ ng/ml}$ 2h μετά, $9,815 \pm 4,35 \text{ ng/ml}$ 24h μετά και $7,02 \pm 2,16 \text{ ng/ml}$ 48h μετά από το επεισόδιο καταπόνησης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές

παρουσιάζονται μεταξύ των τιμών των δύο πρώτων ωρών και των τιμών μετά το εικοσιτετράωρο (Διάγραμμα 3.2.2) ($p=0,001$, $F=7,59$).



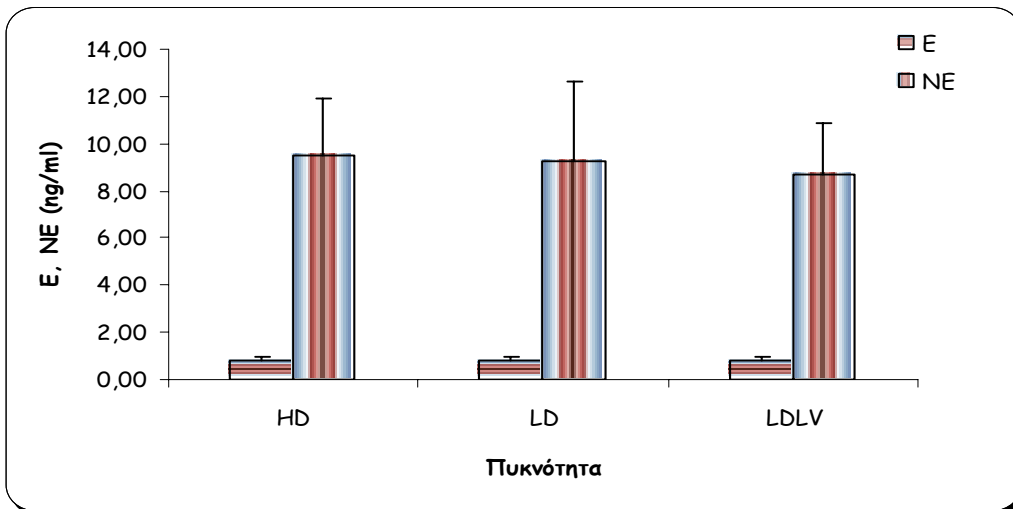
Διάγραμμα 3.2.2. Κορτιζόλη (ng/ml), 30', 2h, 24h και 48h, μετά από οξεία καταπόνηση. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P<0.05$).

Πείραμα 4

Πυκνότητα εκτροφής και καταπόνηση

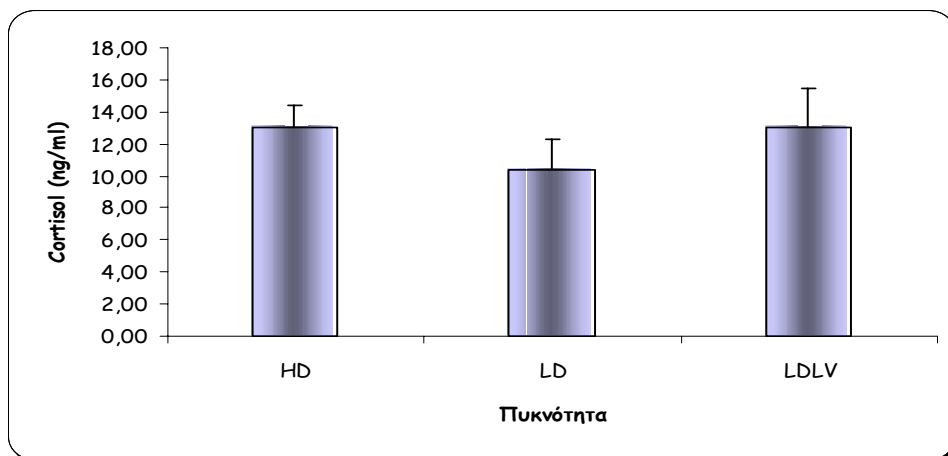
Πρωτογενής απόκριση

Οι συγκεντρώσεις των κατεχολαμινών (E, NE) στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν $0,84\pm 0,145$ ng/ml και $9,51\pm 2,45$ ng/ml (mean \pm SEM) αντίστοιχα για τα ψάρια της Ομάδας HD, $0,8\pm 0,155$ ng/ml και $9,23\pm 3,45$ ng/ml για τα ψάρια της Ομάδας LD και $0,84\pm 0,115$ ng/ml και $8,68\pm 2,185$ ng/ml για τα ψάρια της Ομάδας LDLV. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p_E=0,98$, $p_{NE}=0,79$, $F_E=0,02$ $F_{NE}=0,24$).



Διάγραμμα 4.1. Συγκέντρωση κατεχολαμινών (E, NE) σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV).

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $13,00 \pm 1,43 \text{ ng/ml}$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια της Ομάδας HD, $10,38 \pm 1,89 \text{ ng/ml}$ για τα ψάρια της Ομάδας LD και $13,01 \pm 2,45 \text{ ng/ml}$ για τα ψάρια της Ομάδας LDLV. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p=0,57$, $F=0,57$).

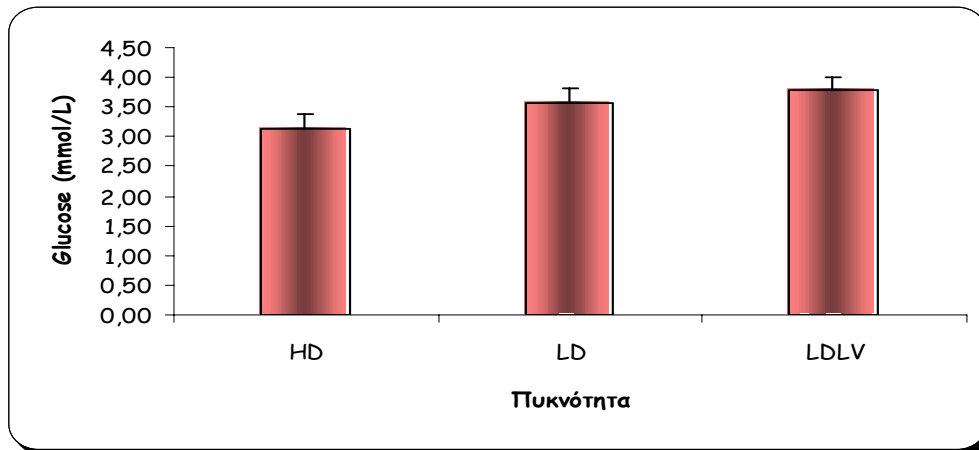


Διάγραμμα 4.2. Συγκέντρωση κορτιζόλης σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV).

Δευτερογενής απόκριση

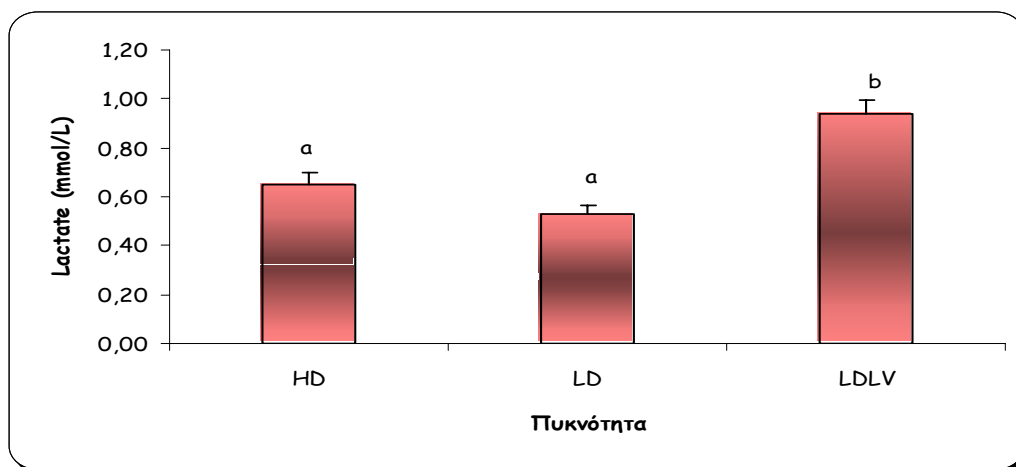
Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στον ορό του αίματος βρέθηκαν $3,13 \pm 0,25 \text{ mmol/L}$

(mean±SEM) στα ψάρια σε υψηλή πυκνότητα (HD), $3,58\pm 0,23$ mmol/L στα ψάρια σε χαμηλή πυκνότητα (LD) και $3,78\pm 0,21$ mmol/L για τα ψάρια σε χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο (LDLV). Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p=0,141$, $F=2,08$).



Διάγραμμα 4.3. Συγκέντρωση γλυκόζης σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV).

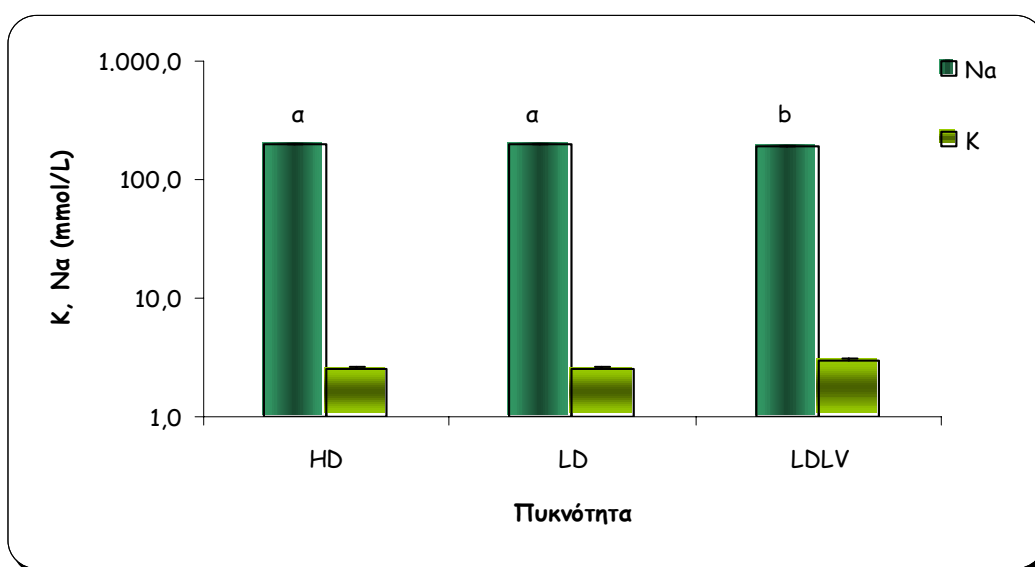
Οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος βρέθηκαν $0,65\pm 0,052$ mmol/L (mean±SEM) στην Ομάδα HD, $0,53\pm 0,036$ mmol/L στην Ομάδα LD και $0,94\pm 0,058$ mmol/L στην Ομάδα LDLV. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της Ομάδας LDLV και των άλλων ομάδων ($p<0,001$, $F=17,70$).



Διάγραμμα 4.4. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά

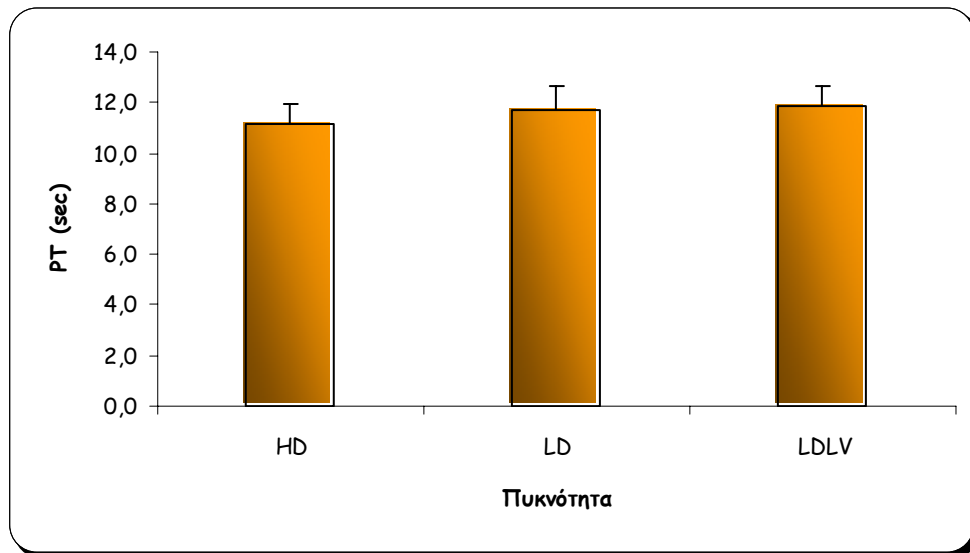
γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Οι συγκεντρώσεις των ηλεκτρολυτών (K, Na) στον ορό του αίματος βρέθηκαν $2,55 \pm 0,10 \text{ mmol/L}$ και $201,52 \pm 1,25 \text{ mmol/L}$ (mean \pm SEM) αντίστοιχα για τα ψάρια της Ομάδας HD, $2,5 \pm 0,18 \text{ mmol/L}$ και $199,3 \pm 2,81 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια της Ομάδας LD και $3,03 \pm 0,14 \text{ mmol/L}$ και $189,13 \pm 2,72 \text{ mmol/L}$ για τα ψάρια της Ομάδας LDLV. Οι τιμές του νατρίου παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ψαριών σε χαμηλή πυκνότητα και χαμηλό διαθέσιμο όγκο και των άλλων ομάδων ($p_K = 0,08$, $p_{Na} = 0,01$, $F_K = 3,48$ $F_{Na} = 6,71$) (Διάγραμμα 4.5).



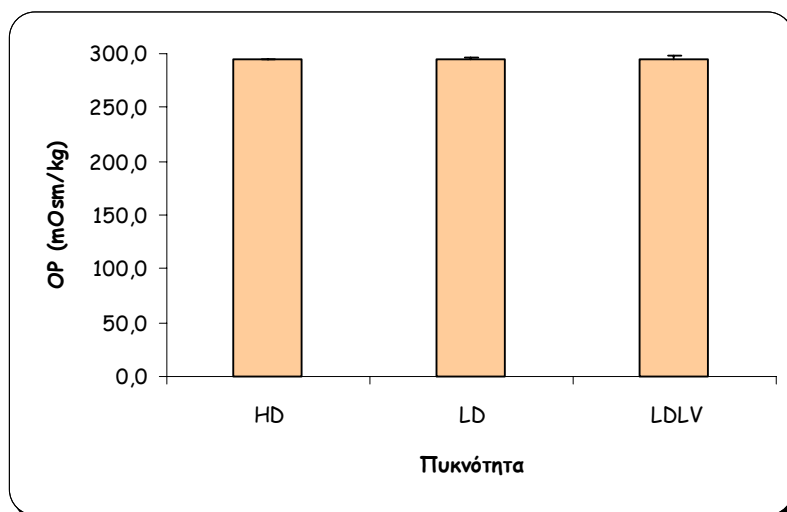
Διάγραμμα 4.5. Συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (K, Na) σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Ο χρόνος προθρομβίνης στον ορό του αίματος βρέθηκε $11,13 \pm 0.803 \text{ sec}$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια της ομάδας HD, $11,70 \pm 0.953 \text{ sec}$ για τα ψάρια της ομάδας LD και $11,86 \pm 0.805 \text{ sec}$ για τα ψάρια της ομάδας LDLV. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Διάγραμμα 4.6).



Διάγραμμα 4.6. Χρόνος προθρομβίνης (PT) σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

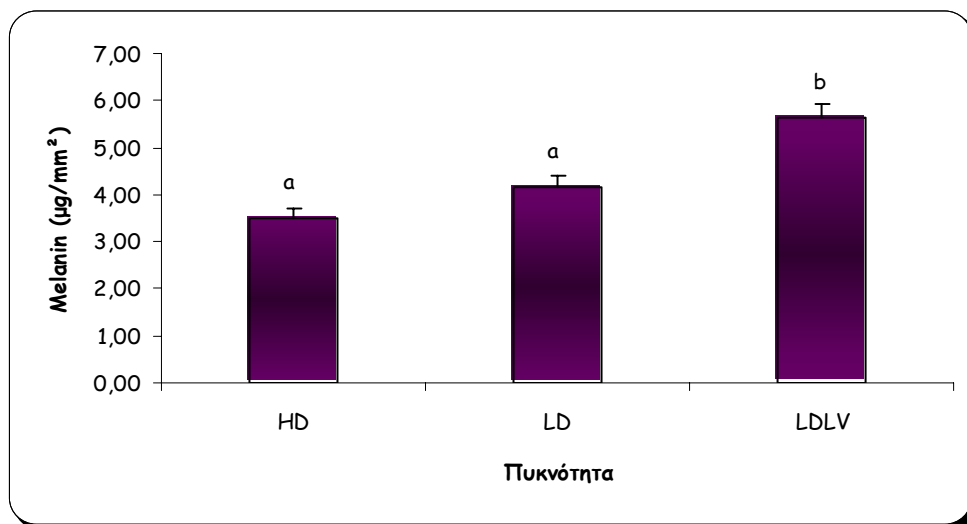
Η οσμωτική πίεση στον ορό του αίματος βρέθηκε $294,55 \pm 0,8 \text{ mOsm/Kg}$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια της Ομάδας HD, $295,4 \pm 1,1 \text{ mOsm/Kg}$ για τα ψάρια της Ομάδας LD και $295,33 \pm 2,1 \text{ mOsm/Kg}$ για τα ψάρια της Ομάδας LDLV. Οι τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p=0,88$, $F=0,13$).



Διάγραμμα 4.7. Οσμωτική πίεση σε ψάρια που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV).

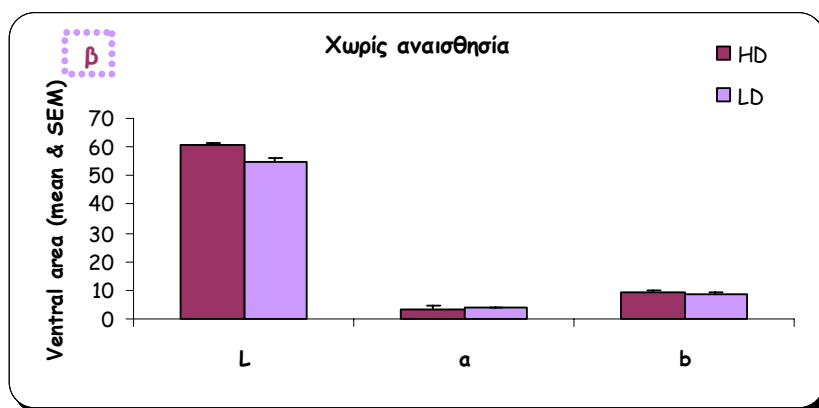
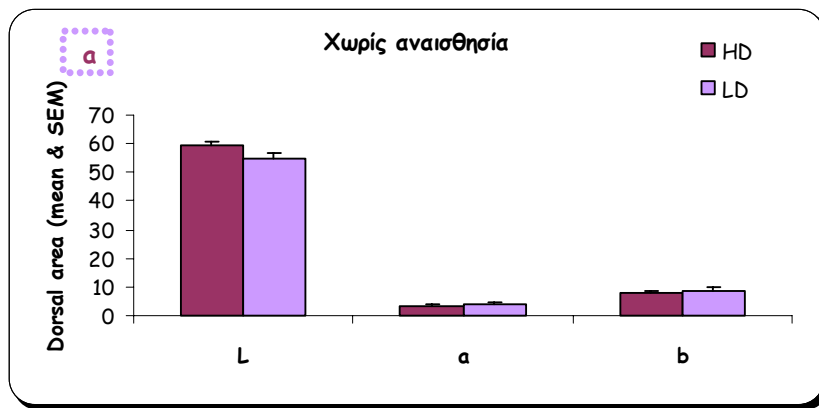
Η ποσότητα μελανίνης του δέρματος βρέθηκε $3,51 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (mean \pm SEM) για τα ψάρια σε υψηλή πυκνότητα (HD), $4,18 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ για τα ψάρια σε χαμηλή

πυκνότητα (LD) και $5.63 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ για τα ψάρια σε χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο (LDLV). Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων υψηλής (HD) και χαμηλής πυκνότητας (LD) με την ομάδα ψαριών σε χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο (LDLV) ($p < 0,001$, $F = 14,52$) (Διάγραμμα 4.8).



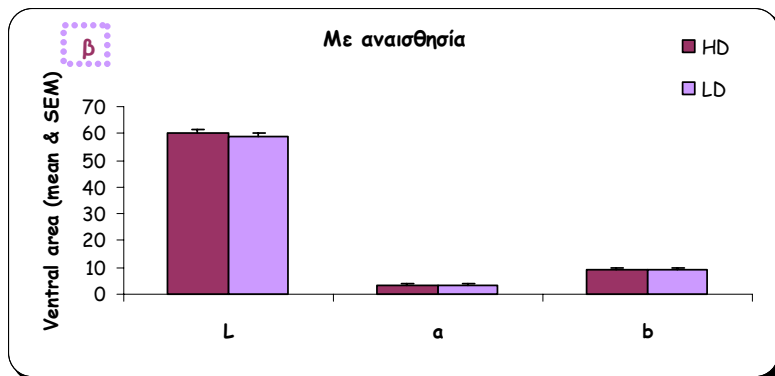
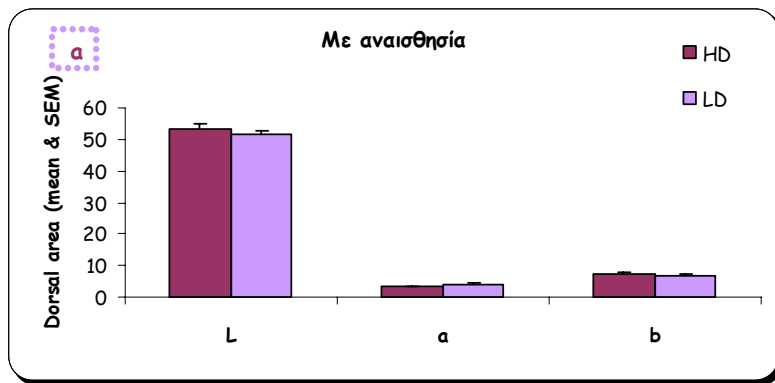
Διάγραμμα 4.8. Ποσότητα μελανίνης στο δέρμα ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD) και χαμηλή πυκνότητα με χαμηλό διαθέσιμο όγκο κολύμβησης (LDLV). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Όσον αφορά στο χρώμα του δέρματος (L, α , b) οι τιμές που βρέθηκαν για **μη αναισθητοποιημένα άτομα** είναι: Στην **ραχιαία** περιοχή (Dorsal): $L = 59,55 \pm 0,94$ (mean \pm SEM), $\alpha = 3,39 \pm 0,8$ και $b = 7,7 \pm 0,6$ για την ομάδα υψηλής πυκνότητας (HD) και $L = 54,56 \pm 2,07$ (mean \pm SEM), $\alpha = 3,76 \pm 0,54$ και $b = 8,85 \pm 0,84$ για την ομάδα χαμηλής πυκνότητας (LD). Στην **κοιλιακή** περιοχή (Ventral): $L = 65,13 \pm 1,06$ (mean \pm SEM), $\alpha = 4,38 \pm 1,23$ και $b = 10,52 \pm 0,69$ για την ομάδα υψηλής πυκνότητας (HD) και $L = 60,55 \pm 1,65$, $\alpha = 3,17 \pm 0,32$ και $b = 9,37 \pm 0,69$ για την ομάδα χαμηλής πυκνότητας (LD). Οι παραπάνω τιμές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Διάγραμμα 4.9α και β).



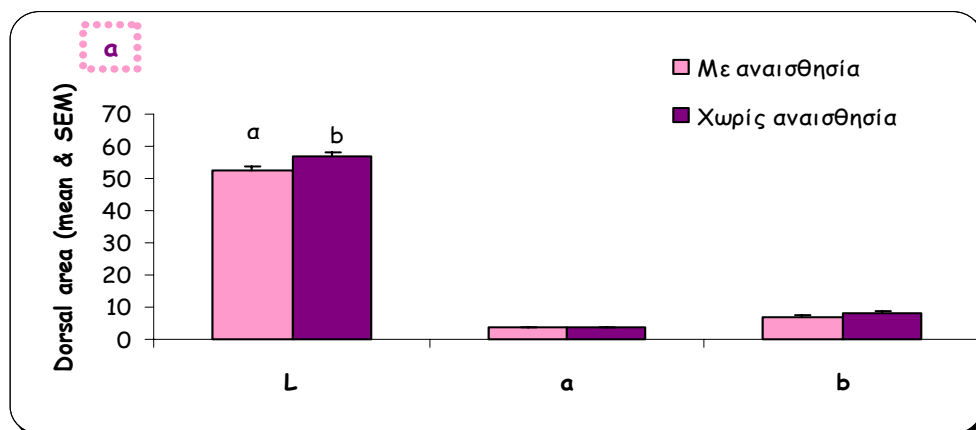
Διάγραμμα 4.9. Χρώμα του δέρματος μη αναισθητοποιημένων ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD). **α.** Ραχιαία περιοχή, **β.** Κοιλιακή περιοχή.

Οι αντίστοιχες τιμές για **αναισθητοποιημένα άτομα** είναι: Στην **ραχιαία** περιοχή (Dorsal): L=53,32±1,7 (mean±SEM), α=3,27±0,35 και b=7,29±0,36 για την ομάδα υψηλής πυκνότητας (HD) και L=51,78±1,12, α=3,76±0,45 και b=6,86±0,7 για την ομάδα χαμηλής πυκνότητας (LD). Στην **κοιλιακή** περιοχή (Ventral): L=59,9±1,45 (mean±SEM), α=3,36±0,34 και b=9,09±0,46 για την ομάδα υψηλής πυκνότητας (HD) και L=59,12±1,03, α=3,45±0,29 και b=9,01±0,55 για την ομάδα χαμηλής πυκνότητας (LD). Οι παραπάνω τιμές αυτές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Διάγραμμα 4.10α και β).

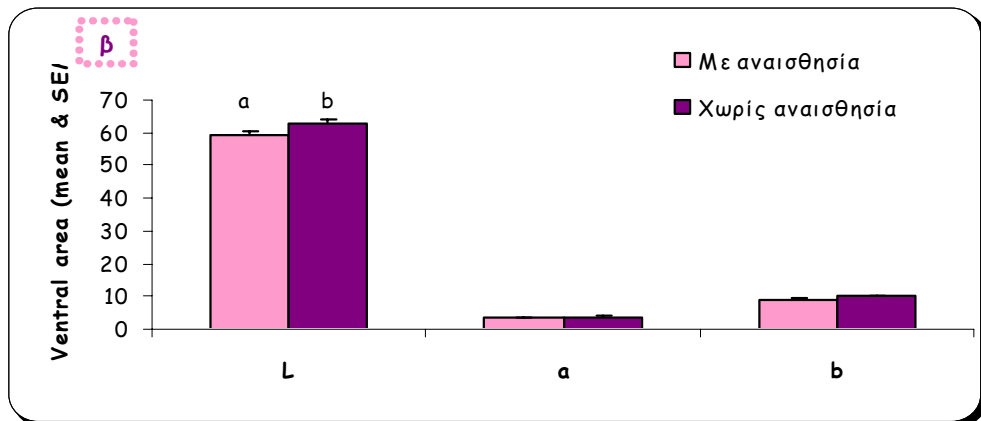


Διάγραμμα 4.10. Χρώμα του δέρματος μη αναισθητοποιημένων ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή πυκνότητα (HD), χαμηλή πυκνότητα (LD). α. Ραχιαία περιοχή, β. Κοιλιακή περιοχή.

Συγκρίνοντας το χρώμα μεταξύ αναισθητοποιημένων και μη ατόμων, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο L και της ραχιαίας και της κοιλιακής περιοχής του σώματος ($p_{\text{Dorsal}}=0,01$, $p_{\text{Ventral}}=0,05$) (Διάγραμματα 4.11α και β). Οι τιμές των L, α, b είναι για την **ραχιαία** περιοχή: $L=52,55\pm 1,01$ (mean±SEM), $\alpha=3,52\pm 0,29$ και $b=7,08\pm 0,39$ για τα αναισθητοποιημένα άτομα και $L=57,06\pm 1,32$, $\alpha=3,58\pm 0,46$ και $b=8,28\pm 0,52$ για τα μη αναισθητοποιημένα άτομα, ενώ για την **κοιλιακή** περιοχή: $L=59,51\pm 0,88$, $\alpha=3,4\pm 0,22$ και $b=9,05\pm 0,35$ για τα αναισθητοποιημένα άτομα και $L=62,63\pm 1,21$, $\alpha=3,72\pm 0,58$ και $b=9,89\pm 0,5$ για τα μη αναισθητοποιημένα άτομα.



Διάγραμμα 4.11 α. Χρώμα του δέρματος αναισθητοποιημένων και μη ιχθύων. Ραχιαία περιοχή. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P<0.05$).



Διάγραμμα 4.11 β. Χρώμα του δέρματος αναισθητοποιημένων και μη ιχθύων. Κοιλιακή περιοχή. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Κατά την δοκιμασία βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών που προσδιορίστηκαν, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ:

- α) **Νορεπινεφρίνης και Επινεφρίνης** με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,882$) ($p = 1,07 \cdot 10^{-11}$)
- β) **Κορτιζόλης και ποσότητα Μελανίνης στο δέρμα**, με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,248$) ($p = 0,03$).

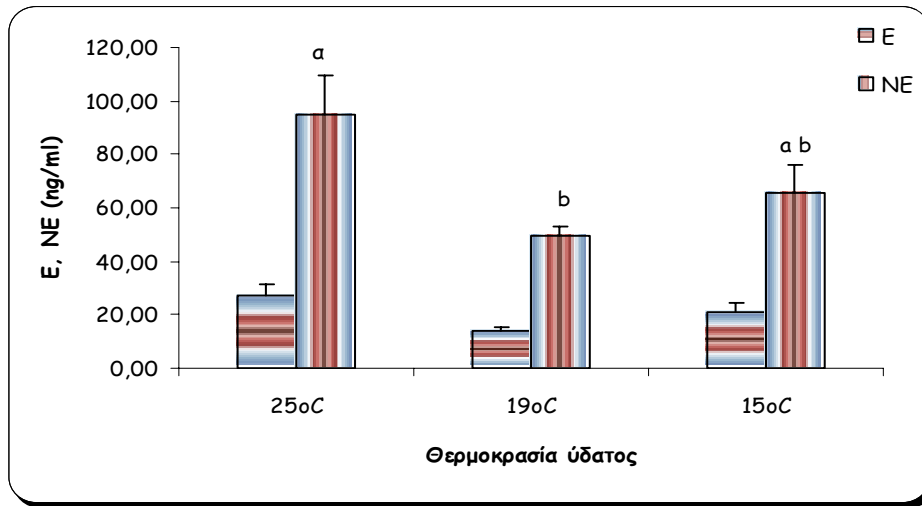
Πείραμα 5

Θερμοκρασία εκτροφής και καταπόνηση

Πρωτογενής απόκριση

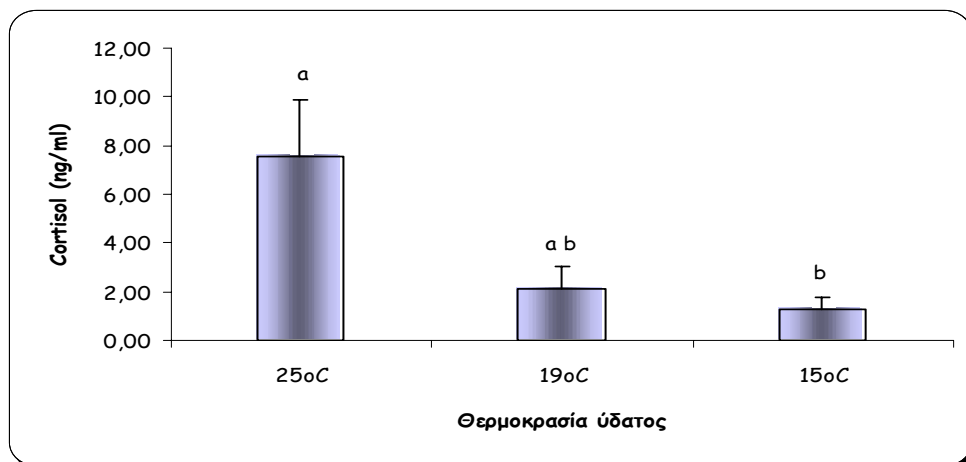
Η συγκέντρωση κατεχολαμινών (E, NE) στο πλάσμα των ψαριών που εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες ύδατος βρέθηκε $21,23 \pm 3,44$ και $65,33 \pm 10,37 \text{ ng/ml}$ αντιστοίχα για τα ζώα της Ομάδας T-25 (έκθεση στους 25°C), $14,14 \pm 1,01$ και $49,48 \pm 3,52$ για τα ζώα της Ομάδας T-19 (έκθεση στους 19°C) και $27,07 \pm 4,15$ και $94,75 \pm 14,52$ για τα ζώα της Ομάδας T-15 (έκθεση στους 15°C). Οι παραπάνω

τιμές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της νορεπινεφρίνης της ομάδας της Ομάδας T-19 και της ομάδας της Ομάδας T-25 ($p_E=0,063$, $p_{NE}=0,038$, $F_E=3,69$, $F_{NE}=4,79$) (Διάγραμμα 5.1).



Διάγραμμα 5.1. Συγκέντρωση κατεχολαμινών (E, NE) σε ψάρια σε ψάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C , 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P<0.05$).

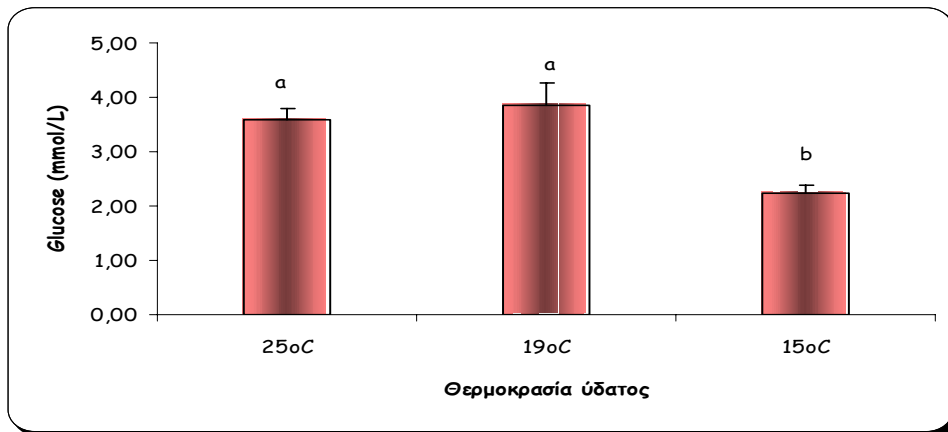
Η συγκέντρωση κορτιζόλης στον ορό του αίματος των ψαριών που εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες ύδατος βρέθηκε $7,56 \pm 2,31$ ng/ml (mean \pm SEM) για τα ζώα της Ομάδας T-25, $2,14 \pm 0,91$ για τα ζώα ομάδας T-19 και $1,25 \pm 0,53$ για τα ζώα Ομάδας T-15. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της Ομάδας T-15 και της Ομάδας T-25 ($p=0,008$, $F=5,89$) (Διάγραμμα 5.2).



Διάγραμμα 5.2. Συγκέντρωση κορτιζόλης σε ψάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C , 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

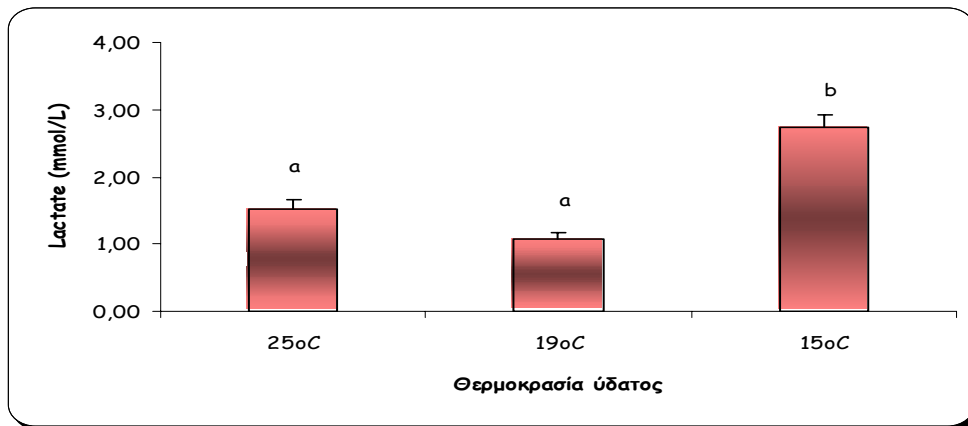
Δευτερογενής απόκριση

Η συγκέντρωση γλυκόζης στον ορό του αίματος των ψαριών που εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες ύδατος βρέθηκε $3,57 \pm 0,23 \text{ mmol/L}$ για τα ζώα της Ομάδας T-25, $3,85 \pm 0,43$ για τα ζώα της Ομάδας T-19 και $2,22 \pm 0,15$ για τα ζώα της Ομάδας T-15. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ($p = < 0,001$, $F = 11,85$) (Διάγραμμα 5.3).



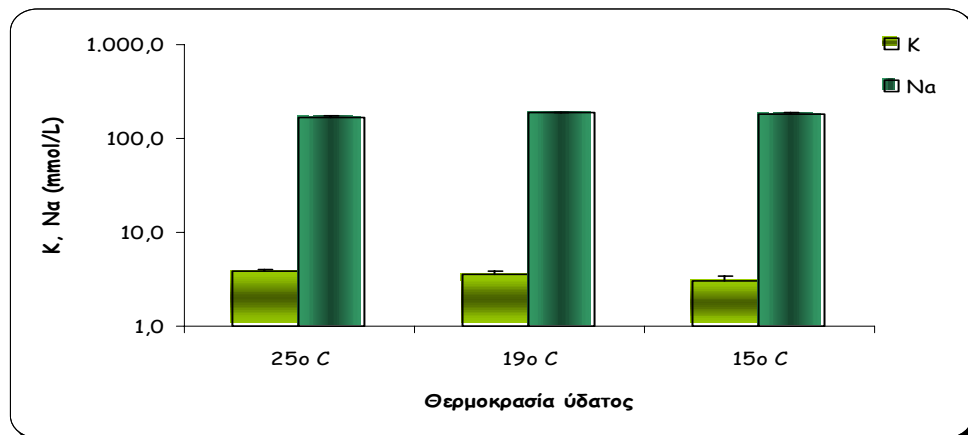
Διάγραμμα 5.3. Συγκέντρωση γλυκόζης σε ψάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C , 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος βρέθηκε $1,53 \pm 0,13 \text{ mmol/L}$ (mean ± SEM) για τα ζώα της Ομάδας T-25, $1,07 \pm 0,1$ για τα ζώα της Ομάδας T-19 και $2,73 \pm 0,2$ για τα ζώα της Ομάδας T-15. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p = < 0,001$, $F = 33,52$) (Διάγραμμα 5.4).



Διάγραμμα 5.4. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε ψάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

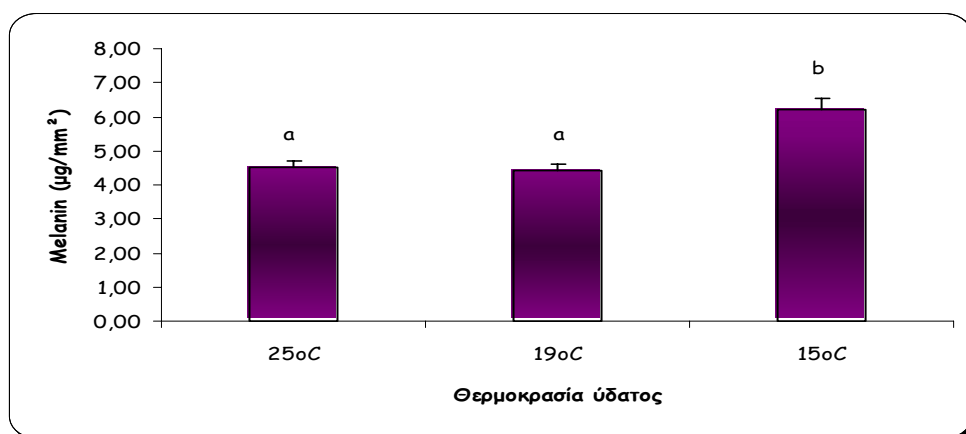
Η συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (K, Na) στον ορό του αίματος των ψαριών που εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες νερού βρέθηκε $3,85 \pm 0,2$ και $170,61 \pm 4,56$ mmol/L αντίστοιχα για τα ζώα Ομάδας T-25, $3,63 \pm 0,22$ και $186,26 \pm 6,1$ για τα ζώα Ομάδας T-19 και $3,08 \pm 0,34$ και $180 \pm 9,87$ για τα ζώα Ομάδας T-15. Οι παραπάνω τιμές δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ($p_K = 0,13$, $p_{Na} = 0,33$, $F_K = 2,36$, $F_{Na} = 1,20$) (Διάγραμμα 5.5).



Διάγραμμα 5.5. Συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (K, Na) σε ψάρια που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, 19°C και 15°C.

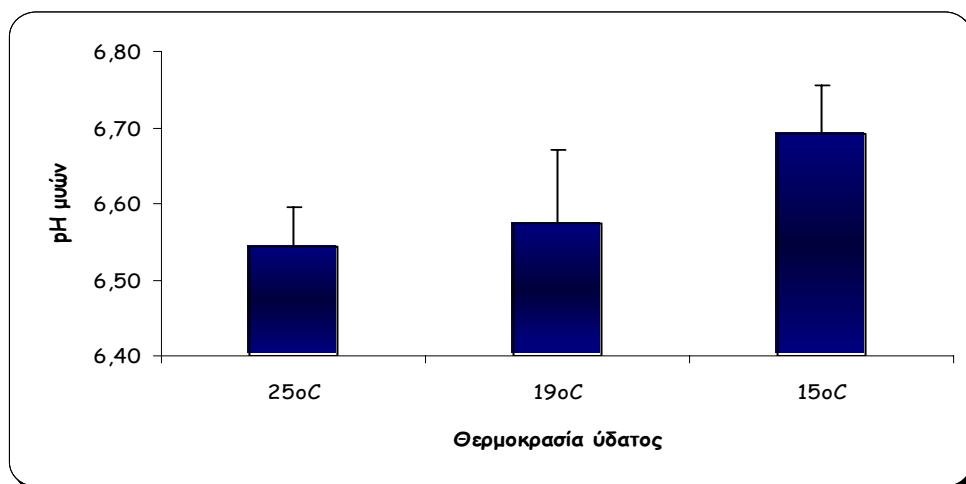
Η ποσότητα μελανίνης του δέρματος βρέθηκε $4,51 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (mean \pm SEM) για τα ζώα της ομάδας T-25, $4,43 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ για τα ζώα της Ομάδας T-19 και $6,23 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ για τα ζώα της ομάδας T-15. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων T-25 και T-19 με την ομάδα

ψαριών T-15 ($p < 0,001$, $F = 19,48$) (Διάγραμμα 5.6).



Διάγραμμα 5.6. Ποσότητα μελανίνης στο δέρμα ιχθύων που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0,05$).

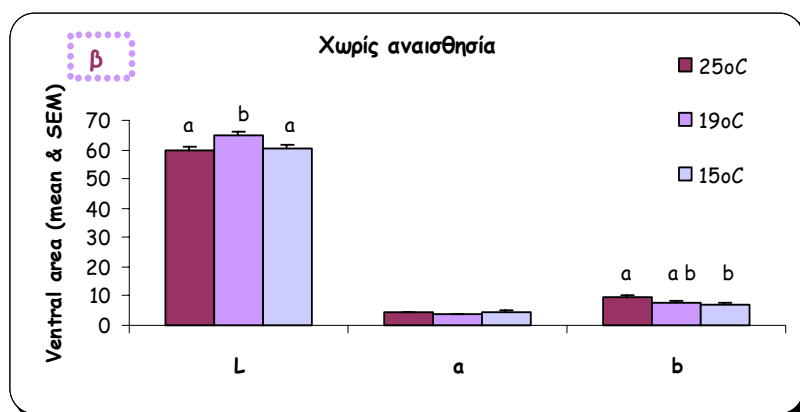
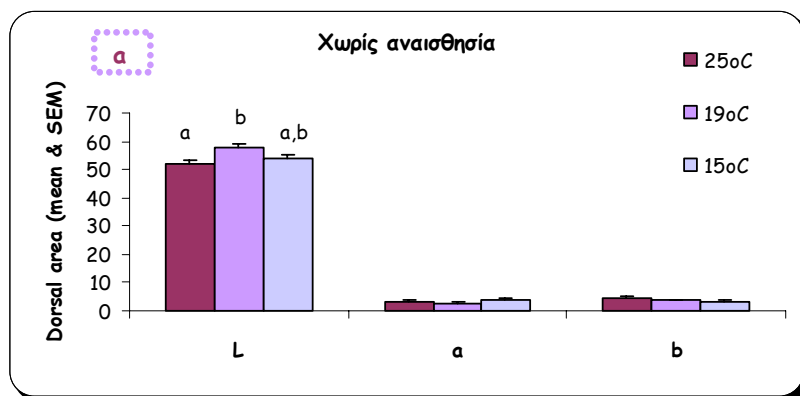
Το pH των μυών σε ψαριά που εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες νερού βρέθηκε $6,54 \pm 0,05$ (mean \pm SEM) για τα ζώα Ομάδας T-25, $6,58 \pm 0,1$ για τα ζώα Ομάδας T-19 και $6,69 \pm 0,07$ για τα ζώα Ομάδας T-15. Οι τιμές αυτές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας σε θερμοκρασία νερού 15°C και των άλλων ομάδων (Διάγραμμα 5.7).



Διάγραμμα 5.7. pH μυών σε ψαριά που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C, 19°C και 15°C. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0,05$).

Όσον αφορά στο χρώμα του δέρματος (L, α , b) οι τιμές που βρέθηκαν για **μη αναίσοθητοποιημένα άτομα** είναι: Στην **ραχιαία** περιοχή (Dorsal): $L = 51,83 \pm 1,26$

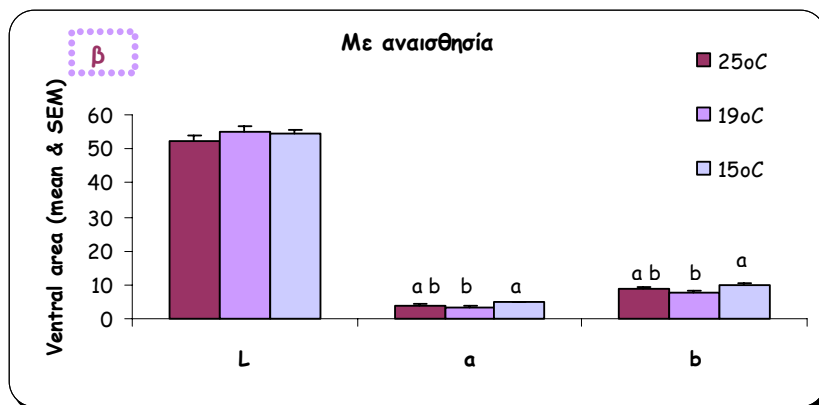
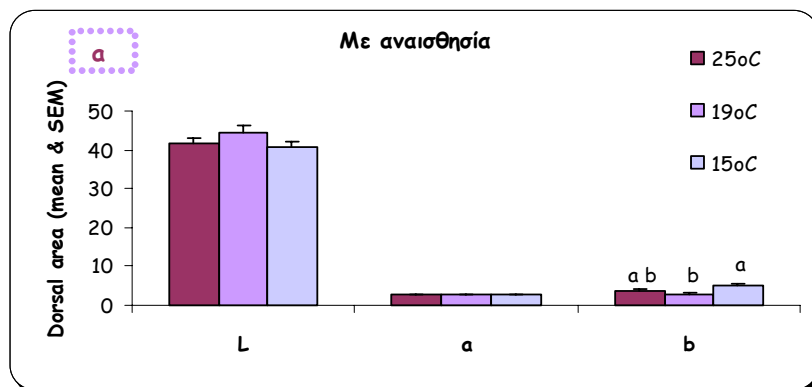
(mean±SEM), $\alpha=3,23\pm0,35$ και $b=4,53\pm0,53$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, $L=57,63\pm1,5$, $\alpha=2,47\pm0,68$ και $b=3,7\pm0,41$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 19°C και $L=53,8\pm1,4$, $\alpha=3,78\pm0,67$ και $b=3,42\pm0,42$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 15°C. Στην **κοιλιακή** περιοχή (Ventral): $L=59,47\pm1,31$, $\alpha=4,34\pm0,42$ και $b=9,31\pm0,79$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, $L=64,96\pm1,1$, $\alpha=3,7\pm0,4$ και $b=7,85\pm0,55$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 19°C και $L=60,59\pm0,88$, $\alpha=4,76\pm0,49$ και $b=7,21\pm0,3$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 15°C. Οι τιμές του L στην ραχιαία και στην κοιλιακή περιοχή αλλά και οι τιμές του b στην κοιλιακή περιοχή των ζώων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Διάγραμμα 5.8α και β).



Διάγραμμα 5.8. Χρώμα του δέρματος μη αναισθητοποιημένων που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C , 19°C και 15°C. **α.** Ραχιαία περιοχή, **β.** Κοιλιακή περιοχή. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P<0.05$).

Οι αντίστοιχες τιμές για **αναισθητοποιημένα άτομα** είναι: Στην **ραχιαία** περιοχή (Dorsal): $L=41,73\pm1,42$ (mean±SEM), $\alpha=2,65\pm0,27$ και $b=3,6\pm0,6$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, $L=44,57\pm1,75$, $\alpha=2,64\pm0,37$ και $b=3,0\pm0,4$ για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 19°C και

L=40,76±1,55, α=2,63±0,35 και b=5,07±0,41 για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 15°C. Στην κοιλιακή περιοχή (Ventral): L=52,45±1,43 (mean±SEM), α=4,08±0,23 και b=8,82±0,5 για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 25°C, L=55,23±1,63, α=3,52±0,46 και b=7,7±0,27 για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 19°C και L=54,61±1,25, α=4,9±0,18 και b=9,82±0,61 για τα ζώα που βρισκόταν σε θερμοκρασία ύδατος 15°C. Οι τιμές του b στην ραχιαία και την κοιλιακή περιοχή των ζώων, καθώς και του α στην κοιλιακή περιοχή παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Διάγραμμα 5.9α και β).



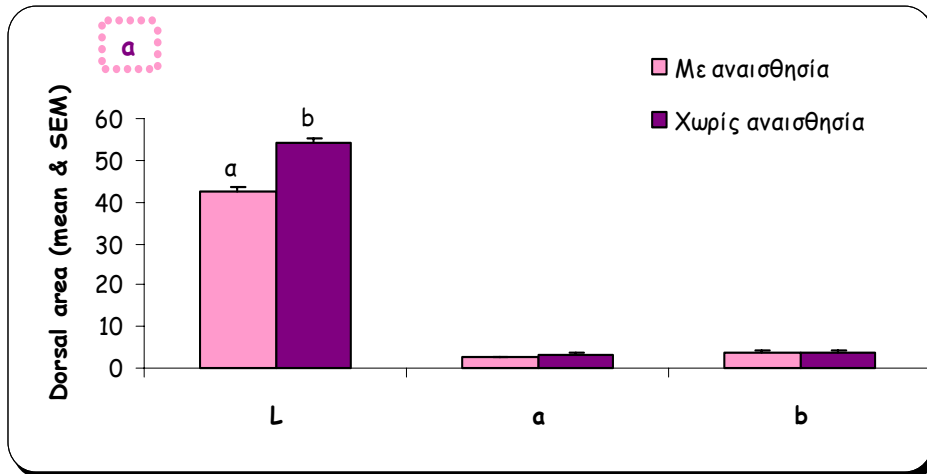
Διάγραμμα 5.9. Χρώμα του δέρματος αναισθητοποιημένων ιχθύων που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C, 19°C και 15°C. **α.** Ραχιαία περιοχή, **β.** Κοιλιακή περιοχή. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Η διαφορά στην φωτεινότητα του δέρματος στις διαφορετικές θερμοκρασίες ύδατος στα ενυδρεία, φαίνεται και στην εικόνα 5.1.



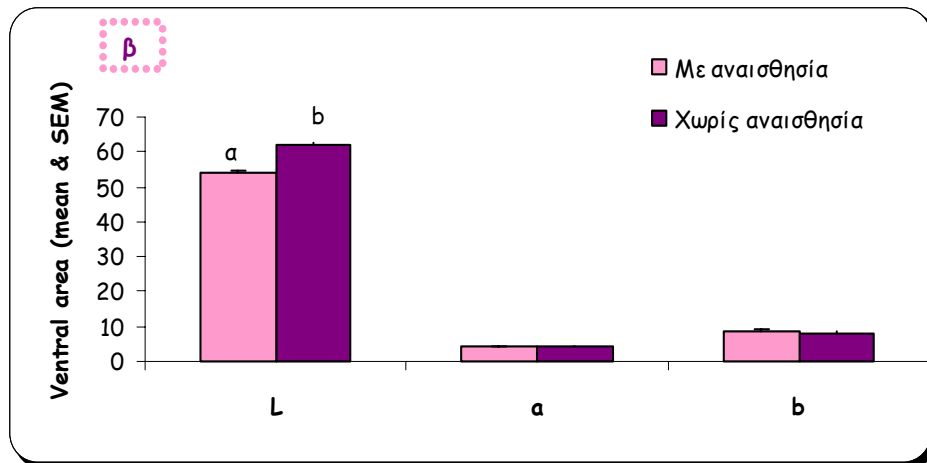
Εικόνα 5.1. Χρώμα του δέρματος ιχθύων που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία νερού 25°C (αριστερά), 19°C (κέντρο) και 15°C (δεξιά).

Συγκρίνοντας το χρώμα μεταξύ αναισθητοποιημένων και μη ατόμων, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο L και της ραχιαίας και της κοιλιακής περιοχής του σώματος ($p < 0,001$) (Διάγραμμα 5.9α και β). Οι τιμές των L, α , b είναι για την **ραχιαία** περιοχή: $L=42,36 \pm 0,93$ (mean \pm SEM), $\alpha=2,64 \pm 0,19$ και $b=3,89 \pm 0,31$ για τα αναισθητοποιημένα άτομα και $L=54,13 \pm 0,89$, $\alpha=3,16 \pm 0,34$ και $b=3,88 \pm 0,27$ για τα μη αναισθητοποιημένα άτομα, ενώ για την **κοιλιακή** περιοχή: $L=54,1 \pm 0,83$, $\alpha=4,17 \pm 0,2$ και $b=8,78 \pm 0,31$ για τα αναισθητοποιημένα άτομα και $L=61,71 \pm 0,78$, $\alpha=4,27 \pm 0,26$ και $b=8,13 \pm 0,36$ για τα μη αναισθητοποιημένα άτομα.



Διάγραμμα 5.10α. Χρώμα του δέρματος αναισθητοποιημένων και μη ιχθύων. Ραχιαία περιοχή.

Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).



Διάγραμμα 5.10β. Χρώμα του δέρματος αναισθητοποιημένων και μη ιχθύων. Κοιλιακή περιοχή.

Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P < 0.05$).

Κατά την δοκιμασία βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών που προσδιορίστηκαν, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ:

α) Γαλακτικού οξέος και Γλυκόζης, με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,265$), το οποίο σημαίνει ότι οι τιμές των δύο μεταβλητών αυξομειώνονται αντιστρόφως ανάλογα ($p = 0,0036$)

β) Νορεπινεφρίνης και Επινεφρίνης με συντελεστή συσχέτισης θετικό ($r^2 = 0,998$), το οποίο σημαίνει ότι οι τιμές των δύο μεταβλητών αυξομειώνονται ανάλογα ($p = 1,63 \cdot 10^{-73}$)

- γ) **Επινεφρίνης και Καλίου**, με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,384$)
($p=0,014$)
- δ) **Καλίου και pH μυών**, με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -0,336$)
($p=0,024$)
- ε) **Ποσότητα μελανίνης και γαλακτικού οξέος** με συντελεστή συσχέτισης
θετικό ($r^2 = 0,39$) ($p=3,92 \cdot 10^{-4}$)
- ζ) **Ποσότητα μελανίνης και Καλίου** με συντελεστή συσχέτισης αρνητικό ($r^2 = -$
 $0,34$) ($p=0,024$).

Παράρτημα

Αναισθησία	mean	SEM		Ανάκαμψη	mean	SEM
0,3 ml/L	00:00:53	00:00:04		0,3 ml/L	00:03:12	00:00:08
0,5 ml/L	00:00:42	00:00:01	και	0,5 ml/L	00:02:30	00:00:19
0,7 ml/L	00:00:33	00:00:01		0,7 ml/L	00:02:14	00:00:09
0,9 ml/L	00:00:33	00:00:01		0,9 ml/L	00:02:24	00:00:09

Πίνακας 2.1.1. Χρόνος που απαιτείται για την αναισθητοποίηση και την ανάκαμψη των ζώων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 2-φαινοξυαιθανόλης.

Αναισθησία	mean	SEM		Ανάκαμψη	mean	SEM
0,03 ml/L	00:04:38	00:00:22		0,03 ml/L	00:06:38	00:00:37
0,06 ml/L	00:02:06	00:00:11	και	0,06 ml/L	00:05:43	00:00:39
0,09 ml/L	00:01:26	00:00:08		0,09 ml/L	00:04:52	00:00:16
0,12 ml/L	00:01:15	00:00:05		0,12 ml/L	00:03:43	00:00:24

Πίνακας 2.1.2. Χρόνος που απαιτείται για την αναισθητοποίηση και την ανάκαμψη των ζώων στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γαρυφαλέλαιου.



Τιμές εκκίνησης

Καθορισμός τιμών εκκίνησης

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα οι τιμές εκκίνησης υπολογίζονται από τις τιμές

- των ψαριών που αναισθητοποιήθηκαν με τη χρήση του αναισθητικού 2-φαινοξυαιθανόλη, το οποίο όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα είναι το αναισθητικό επιλογής για το είδος *Pagrus pagrus*, (πειράμα 2.2),
- τις τιμές των μη καταπονημένων ψαριών, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών που υπέστησαν το κατέβασμα του νερού της δεξαμενής με σιφόνι 10–15 min πριν τη δειγματοληψία (Πειράμα 3.1) και
- τις τιμές των ψαριών που εκτέθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα (Ομάδα LD του πειράματος 4).

Έτσι οι τιμές εκκίνησης σε ποσοστό 95% είναι:

Γλυκόζη (Glucose):	2,01–5,21 mmole L ⁻¹
Γαλακτικό (Lactate):	0,09–1,95 mmol L ⁻¹
Επινεφρίνη (E):	0,39–5,61 ng ml ⁻¹
Νορεπινεφρίνη (NE):	1,37–9,77 ng ml ⁻¹
Κορτιζόλη (F):	0,95–22,93 ng ml ⁻¹
Κάλιο (K):	2,00–4,51 mmole L ⁻¹
Νάτριο (Na):	166,96–196,17 mmole L ⁻¹
Οσμωτική πίεση (OP):	288,40–302,41 mOsm Kg ⁻¹
Χρόνος προθρομβίνης (PT):	6,78–17,44 sec
Μελανίνη (Melanin):	2,78–5,58 µg/mm ²



Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού της κορτιζόλης, αξιολογήθηκε ραδιοανοσολογική (εμπορική) μέθοδος προσδιορισμού των κατεχολαμινών (νορεπινεφρίνης και επινεφρίνης), καθώς και η χρήση κάποιων νέων δεικτών εκτίμησης οξείας και χρόνιας καταπόνησης (χρόνος προθρομβίνης, χρώμα του δέρματος και συγκέντρωση μελανίνης στο δέρμα). Επίσης, καθορίστηκαν οι τιμές εκκίνησης ή αλλιώς τιμές ηρεμίας (baseline ή resting values) για τους παραπάνω δείκτες αλλά και για κλασσικούς δείκτες καταπόνησης, όπως η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και οι ηλεκτρολύτες στο φαγκρί (*Pagrus pagrus*).

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της κορτιζόλης, η οποία αποτελεί ένα αξιόπιστο δείκτη εκτίμησης της οξείας καταπόνησης, έγινε με επιτυχία μέσω της τροποποίησης του πρωτοκόλλου εργασίας του Οργανισμού Παγκόσμιας Υγείας (WHO, World Health Organization) (Sufi et al., 1994), το οποίο προσαρμόστηκε στα δεδομένα των θαλασσινών ιχθύων. Η μέθοδος είναι ακριβής και έχει επαναληψιμότητα.

Η έκκριση κορτιζόλης κατά την καταπόνηση που προκαλείται από διάφορους χειρισμούς στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια, έχει πολλά δυσάρεστα αποτελέσματα στην φυσιολογία των ζώων. Τα αναισθητικά σε χαμηλές δόσεις και για μικρό χρονικό διάστημα μπορούν να μειώσουν ή να ελαχιστοποιήσουν την καταπόνηση στα ψάρια. Η επιλογή του κατάλληλου αναισθητικού εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του, το κόστος, την ευκολία στην χρήση, την φύση της εργασίας και την ασφάλεια του χρήστη (Cho and Heath, 2000). Οι Markin and Mayer (1985), έκαναν μια λίστα με τα χαρακτηριστικά του ιδανικού αναισθητικού. Επιπρόσθετα ένα αναισθητικό θα πρέπει να έχει την ικανότητα να μειώνει την καταπόνηση, παρεμποδίζοντας την δράση του HPI άξονα και να καθιστά τα ψάρια ανίκανα να αποκριθούν σε πρόσθετη καταπόνηση (Olsen et al., 1995, Keene et al., 1998). Υπάρχει έντονη διαφοροποίηση στην αποτελεσματικότητα των αναισθητικών που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες, που εξαρτάται από τον χειριστή, το είδος του ψαριού, την διαδικασία που διενεργείται και μια σειρά από άλλους παράγοντες (Burka et al., 1997). Είναι ξεκάθαρο ότι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη βιολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες όταν διαχειρίζεται ή συγκρίνει

κάποιοι μελέτες που αναφέρονται σε αναισθητικά (Burka et al., 1997, Ross and Ross, 1999). Οι βιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν το είδος, το στάδιο ζωής και την ηλικία, το μέγεθος και το βάρος, την περιεκτικότητα σε λίπος, την κατάσταση του σώματος και την υγεία του ζώου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τον μεταβολικό ρυθμό και κατά συνέπεια την φαρμακοκινητική του αναισθητικού. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την θερμοκρασία και το pH, τα οποία επίσης επηρεάζουν τον μεταβολικό ρυθμό και επιπλέον μεταβάλλουν την εισροή από τα βράγχια και έτσι μειώνουν ή αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του αναισθητικού (Burka et al., 1997, Ross and Ross, 1999).

Η φαινοξυαιθανόλη είναι πολύ διαδεδομένο αναισθητικό στην Γαλλία, την Ισπανία και την Ελλάδα, αλλά όχι στις ΗΠΑ και τον Καναδά, εξαιτίας της πιθανής τοξικότητας για τον χρήστη και τα ψάρια. Το γαρυφαλέλαιο από την άλλη πλευρά είναι διαδεδομένο στην Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, την Χιλή και την Ινδονησία. Στην Ινδονησία χρησιμοποιείται σε ανθρώπους για αιώνες σαν τοπικό αναισθητικό για πονοκεφάλους, πονόδοντους και πόνους στις αρθρώσεις. Είναι ένα σκούρο καφέ υγρό που προέρχεται από απόσταξη του γαρύφαλλου (*Eugenia aromatica*) (Soto and Burhanuddin, 1995). Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα μίγμα από ευγενόλη (85–95%), με ισοευγενόλη και μεθυλευγενόλη. Η μεθυλευγενόλη προκαλεί καρκινογένεση σε τρωκτικά (US FDA, 2002) και γι' αυτό το λόγο το γαρυφαλέλαιο δεν χρησιμοποιείται στις ΗΠΑ. Επίσης το γαρυφαλέλαιο δεν διαλύεται στο νερό σε θερμοκρασίες κάτω των 15°C, όπου πρέπει να διαλυθεί σε αιθανόλη πριν από την χρήση (Iversen, et al., 2003).

Στο φαγκρί, ο χρόνος που χρειάζεται για την αναισθητοποίηση των ζώων με την 2-φαινοξυαιθανόλη είναι, για όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, μικρότερος από 1 λεπτό σε αντίθεση με το γαρυφαλέλαιο που ο απαιτούμενος χρόνος αναισθητοποίησης είναι πολύ μεγαλύτερος για τις μικρές συγκεντρώσεις ενώ πλησιάζει το ένα λεπτό στις μεγαλύτερες από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις. Το ίδιο ισχύει και για τον χρόνο ανάνηψης, όπου για την 2-φαινοξυαιθανόλη είναι για όλες τις συγκεντρώσεις μικρότερος από 3 λεπτά και 12 δευτερόλεπτα ενώ για το γαρυφαλέλαιο είναι από 3 λεπτά και 40 δευτερόλεπτα για τις μεγαλύτερες έως 6 λεπτά και 40 δευτερόλεπτα για τις

μικρότερες από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αναισθητικών που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό στην συνέχεια των δεικτών καταπόνησης είναι $0,35 \text{ mg l}^{-1}$ για την 2-φαινοξυαιθανόλη (συνήθης χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση) και $0,06 \text{ ml l}^{-1}$ για το γαρυφαλέλαιο, στις οποίες τα ψάρια αναισθητοποιούνται σε περίπου ένα και δύο λεπτά αντίστοιχα και ανακάμπτουν σε τρία και έξι λεπτά αντίστοιχα. Από τις συμπεριφορικές αποκρίσεις των ατόμων που παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων αλλά και τις τιμές των δεικτών καταπόνησης φαίνεται ότι η 2-φαινοξυαιθανόλη είναι το αναισθητικό επιλογής για το είδος *Pagrus pagrus*.

Το γαρυφαλέλαιο έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό αναισθητικό για νεαρά άτομα σολομού του ατλαντικού (*Salmo salar*) σε συγκεντρώσεις άνω των 30 mg l^{-1} , σε 8,1–2,2 λεπτά για συγκεντρώσεις $30\text{--}100 \text{ mg l}^{-1}$ αντίστοιχα (Iversen, et al., 2003). Έχει φανεί επίσης ότι ακινητοποιεί αποτελεσματικά τα ψάρια σε χαμηλές δόσεις (Keene et al., 1998, Stehly and Gingerich, 1999, Cho and Heath, 2000). Νεαρά άτομα σολομού του είδους *Oncorhynchus thawytscha*, βάρους 40g σε θερμοκρασία 7°C , αναισθητοποιήθηκαν σε 2 λεπτά σε συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου 20 mg l^{-1} (Cho and Heath, 2000), ενώ άτομα ιριδιζουσας πέστροφας, βάρους 12g σε θερμοκρασία 14°C , σε 2,5 λεπτά, σε συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου 25 mg l^{-1} (Endo et al., 1972). Το ίδιο είδος σε θερμοκρασία $9,1^{\circ}\text{C}$ και βάρους 20,5g, έχασε την ισορροπία σε 1,8–0,6 λεπτά σε συγκεντρώσεις $20\text{--}100 \text{ mg l}^{-1}$ αντίστοιχα (Keene et al., 1998), ενώ οι Anderson et al. (1997), έδειξαν ότι ιριδιζουσες πέστροφες 21,7g σε θερμοκρασία 11°C , σε συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου 40 mg l^{-1} , έχασαν πλήρως την ισορροπία τους σε 4,2 λεπτά. Επίσης στο είδος *Piaractus brachyromus* ($21,5^{\circ}\text{C}$ – 603g), σε συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου 50 mg l^{-1} , χρειάστηκε περίπου 5 λεπτά για την αναισθησία (Sladky et al., 2001).

Αύξηση στην θερμοκρασία φαίνεται να αυξάνει την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών (Olsen et al., 1995, Stehly and Gingerich, 1999). Το μέγεθος φαίνεται επίσης να σχετίζεται θετικά με την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών. Η αποτελεσματικότητα αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους (Olsen et al., 1995). Το είδος του ιχθύος επίσης έχει μεγάλη σημασία (Stehly and Gingerich, 1999).

Οι δείκτες καταπόνησης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δυο

αναισθητικών, αν και οι τιμές της κορτιζόλης, των κατεχολαμινών και των ηλεκτρολυτών για την 2-φαινοξυαιθανόλη ήταν ελαφρώς μικρότερες. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην καθυστέρηση της αναισθητοποίησης, με αποτέλεσμα την αυξημένη κινητικότητα των ψαριών που αναισθητοποιούνται με γαρυφαλέλαιο. Επίσης τα άτομα που αναισθητοποιούνται με γαρυφαλέλαιο έχουν μικρότερη φωτεινότητα στο χρώμα του δέρματος (L) που αποτελεί ένα ακόμα σημάδι καταπόνησης. Για το γαρυφαλέλαιο έχει επίσης αναφερθεί ότι σκουραίνει το χρώμα του δέρματος αισθητά με μακροσκοπική παρατήρηση σε συγκεντρώσεις (100 mg L⁻¹) στο είδος *Siganus lineatus* (Soto and Burhanuddin, 1995). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η χρήση αναισθητικού για την αιμοληψία μειώνει την ενδοκρινική απόκριση, σε σύγκριση με τα μη αναισθητοποιημένα άτομα στο φαγκρί αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Η χρήση αναισθητικού πάντως θεωρείται απαραίτητη και για ηθικούς λόγους λόγω της αναλγησίας που προσφέρει στα ζώα καθώς και για την αποφυγή πιθανών τραυματισμών κατά τους χειρισμούς. Παρόμοια αποτελέσματα με τη δική μας εργασία για την αποτελεσματικότητα του γαρυφαλελαίου έχουν εμφανιστεί και σε άλλα είδη, όπως για παράδειγμα την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και την ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Tort et al., 2002), όπου έχει φανεί ότι το γαρυφαλέλαιο δεν αποτρέπει την ενδοκρινική απόκριση στην καταπόνηση και δεν έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές με την 2-φαινοξυαιθανόλη. Για το λαυράκι (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Davis and Griffin, 2004), τα επίπεδα κορτιζόλης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε καταπονημένα ψάρια σε σύγκριση με μη καταπονημένα άτομα εκτός από αυτά που υπέστησαν αναισθητοποίηση με γαρυφαλέλαιο πριν από το επεισόδιο καταπόνησης. Επίσης έχει ~~απο~~δειχθεί ότι το γαρυφαλέλαιο μειώνει την απόκριση στην καταπόνηση σε νεαρούς και ώριμους σολομούς (*Salmo salar* L.) (Chanseau et al., 2002, Iversen, et al., 2003), σε νεαρά άτομα του είδους *Colossoma macropomum* (Roubach et al., 2003), στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) (Small., 2004), ενώ οι Davis et al. (2002), έδειξαν ταυτόχρονη αύξηση κορτιζόλης και γλυκόζης σε έντονα καταπονημένα, με 2 ώρες περιορισμό, γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*). Το γαρυφαλέλαιο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για δειγματοληψία πληθυσμών ιχθύων τροπικών υφάλων (Ackerman and Bellwood, 2002) και σε δοκιμές στο πεδίο με

άγριο μεταναστευτικό σολομό του είδους *Onchorynchus nerka* (Woody et al., 2002). Για το είδος *Micropterus salmoides*, έχει βρεθεί ότι το γαρυφαλέλαιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναισθητοποιεί ελαφρά τα ψάρια και είναι κατάλληλο για την μείωση της καταπόνησης κατά την μεταφορά (Cooke et al., 2004). Από την άλλη πλευρά έχει αναφερθεί ότι αναισθητικά όπως το γαρυφαλέλαιο που μπλοκάρουν την δράση του HPI άξονα μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, αλλά όχι στις μικρότερες (Cho and Heath, 2000, Iversen, et al., 2003), είναι πιθανόν σε μικρές συγκεντρώσεις να δρουν σαν παράγοντες καταπόνησης και να επιδεινώνουν την απόκριση κορτιζόλης (Strange and Schreck, 1978, Barton and Peter, 1982, Olsen et al., 1995).

Η συγκέντρωση γλυκόζης και γαλακτικού οξέος επίσης δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αναισθητικών και των μη αναισθητοποιημένων ατόμων στο φαγκρί, με το γαλακτικό οξύ να είναι ελαφρώς υψηλότερο στα καταπονημένα άτομα. Η γλυκόζη επίσης δεν παρουσίασε αλλαγές σε νεαρούς σολομούς, αλλά το γαλακτικό οξύ αυξήθηκε σημαντικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις γαρυφαλέλαιου (>20 mg μL^{-1}) (Iversen, et al., 2003). Η γλυκόζη δεν παρουσίασε αλλαγές στις αυξανόμενες δόσεις γαρυφαλέλαιου και τα μη καταπονημένα άτομα του είδους *Colossoma macropomum* (Roubach et al., 2003). Το γαλακτικό οξύ παρέμεινε ανεπηρέαστο από την αναισθησία με γαρυφαλέλαιο στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) (Small., 2004). Το λαυράκι (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) που εκτέθηκε σε γαρυφαλέλαιο παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης σε σχέση με τα επίσης καταπονημένα αλλά χωρίς αναισθησία άτομα (Davis and Griffin, 2004).

Οι κατεχολαμίνες δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών χειρισμών, αλλά η μέση τιμή στην 2-φαινοξυαιθανόλη είναι υποδιπλάσια από αυτή στο γαρυφαλέλαιο. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στον διπλάσιο χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη αναισθησίας στην έκθεση σε γαρυφαλέλαιο. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ψάρια να υπόκεινται καταπόνηση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και οι τιμές των κατεχολαμινών να διατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα για παρατεταμένο χρόνο. Η αναλογία E:NE ήταν πάντα περίπου 0,3. Η χρήση 2-φαινοξυαιθανόλης στην δεξαμενή, πριν την

δειγματοληψία, έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα επινεφρίνης ($19,34 \text{ pmol ml}^{-1}$) και στην ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), μετά από σύλληψη σε δίχτυ και δόνηση, έναντι των μη αναισθητοποιημένων ατόμων (200 pmol ml^{-1}) (Gerwick et al., 1999). Οι τιμές εκκίνησης για την ιριδιζουσα πέστροφα (*Salmo gairdneri*), σε άτομα σε ηρεμία, βρέθηκαν $1,55 \pm 0,90 \text{ pmol ml}^{-1}$ ($x \pm SD$) για την επινεφρίνη και $2,07 \pm 1,26 \text{ pmol ml}^{-1}$ για την νορεπινεφρίνη. Η αναλογία E:NE σε ηρεμία, ήταν πάντα κάτω της μονάδας. Σε δεύτερο πείραμα, μετά από χειρισμό (χειρουργική επέμβαση-αιμοληψία από την ραχιαία αορτή), η επινεφρίνη αυξήθηκε κατά 36 φορές και η νορεπινεφρίνη κατά 15 φορές, από τις τιμές εκκίνησης. Μετά την χειρουργική επέμβαση, τα επίπεδα των κατεχολαμινών μειώθηκαν ταχύτατα, αλλά οι τιμές τους παρέμειναν υψηλότερες από τις τιμές εκκίνησης 6 ώρες αργότερα, ενώ προσέγγισαν τις τιμές εκκίνησης, 24 και 48 ώρες αργότερα. Η αναλογία E:NE ήταν περίπου 3,0 αμέσως μετά την χειρουργική επέμβαση, έπεσε στο 1,8 μετά από 6 ώρες και περίπου στο 1,0 μετά από 24 και 48 ώρες (Gingerich and Drottar, 1989).

Οι ηλεκτρολύτες (K^{\pm} , Na^{\pm}) επίσης δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με την 2-φαινοξυαιθανόλη να προκαλεί ελαφρά μείωση των τιμών τους. Οι τιμές των ηλεκτρολυτών είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν δημοσιευθεί και για άλλα είδη τελεόστεων ιχθύων, όπως είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Pavlidis et al., 1997) αλλά και η συναγρίδα (*Dentex dentex*) (Pavlidis et al., 1999).

Ο χρόνος προθρομβίνης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές αν και η τιμή του είναι μικρότερη στους χειρισμούς με τα αναισθητικά και ιδιαίτερα στο χειρισμό με το γαρυφαλέλαιο, όπου μειώνεται περίπου 2 δευτερόλεπτα.

Το χρώμα παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο στην συνιστώσα b, όπου τα μη αναισθητοποιημένα ψάρια έχουν περισσότερο κίτρινο χρωματισμό από τα αναισθητοποιημένα και στις δύο περιοχές του σώματος (ραχιαία και κοιλιακή).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει στα αποτελέσματα η αρνητική συσχέτιση μεταξύ κορτιζόλης και χρόνου προθρομβίνης, το οποίο σημαίνει ότι στα καταπονημένα ψάρια μειώνεται ο χρόνος προθρομβίνης, δηλαδή αυξάνεται η ταχύτητα πήξης

του αίματος. Ένα συχνό φαινόμενο στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι να πεθαίνουν τα ψάρια αρκετές μέρες μετά από ένα επεισόδιο καταπόνησης, όπως διαχωρισμό μεγεθών ή μεταφορά, πιθανόν ως αποτέλεσμα τραύματος που προκαλεί αυτόματη θρόμβωση (Smith, 1980). Οι τιμές αναφοράς του χρόνου προθρομβίνης για το είδος *Pagrus pagrus*, έχουν καθορισθεί από τους Pavlidis et al. (1999) και βρέθηκαν 9,0–15,0 sec. Οι τιμές των πειραμάτων της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τις παραπάνω τιμές και επιπλέον επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι τα καταπονημένα άτομα έχουν ταχύτερο χρόνο πήξης του αίματος και από το πείραμα της αναισθησίας αλλά και το πείραμα της οξείας καταπόνησης.

Θετική συσχέτιση υπάρχει μεταξύ επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης αλλά και μεταξύ νορεπινεφρίνης και γλυκόζης, όπου και οι δύο αυξάνονται στα μη αναισθητοποιημένα άτομα.

Τα επίπεδα της κορτιζόλης μετά από **οξεία καταπόνηση** ήταν περίπου πενταπλάσια από αυτά των μη καταπονημένων ατόμων και των επίσης μη καταπονημένων ατόμων που υπέστησαν μείωση του επιπέδου του ύδατος της δεξαμενής στο 1/3 με σιφόνι 15 λεπτά πριν τη δειγματοληψία. Η κορτιζόλη αυξάνεται τις 2 πρώτες ώρες και μειώνεται στην συνέχεια για να φτάσει εντός των τιμών εκκίνησης στο πρώτο εικοσιτετράωρο μετά το επεισόδιο οξείας καταπόνησης.

Οι τιμές της κορτιζόλης παρουσιάζουν μεγάλη τυπική απόκλιση μέσα στους πειραματικούς πληθυσμούς γεγονός που, αφού αποκλείσθηκε η πιθανότητα να οφείλεται στην μέθοδο προσδιορισμού της ορμόνης, παραπέμπει στον διαχωρισμό των ατόμων σε ομάδες υψηλής και χαμηλής απόκρισης στην κορτιζόλη. Στο ίδιο συμπέρασμα έχουν καταλήξει ερευνητές για την ιριδιζουσα πέστροφα (Fevolden et al., 1993, 2002, Pottinger and Carrick, 1999a, Trenzado et al., 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των Trenzado et al. (2003), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η μεταβολική απόκριση (απόκριση γλυκόζης) των χαμηλής απόκρισης στην κορτιζόλη ατόμων ήταν εντονότερη από αυτήν των ατόμων υψηλής απόκρισης στην κορτιζόλη. Αντίθετα οι Pottinger and Carrick (1999b), παρατήρησαν ότι η απόκριση κορτιζόλης δεν επηρεάζει την απόκριση της γλυκόζης. Πάντως οι Trenzado et al. (2003), αναφέρουν ότι οι παραπάνω

ερευνητές προσδιόρισαν την γλυκόζη μόνο σε ένα σημείο μετά από 3 ώρες περιορισμού των ζώων και πιθανόν να παρέβλεψαν τις διαφορές. Οι Fenolden et al. (2002) υποστηρίζουν ότι υπάρχει σημαντική ατομική ποικιλότητα στα επίπεδα κορτιζόλης που διεγείρει η καταπόνηση και αυτό έχει γενετική βάση. Πάντως λίγα είναι γνωστά επί του παρόντος για τα λειτουργικά πλεονεκτήματα ή το κόστος του να είναι κάποιο άτομο υψηλής ή χαμηλής απόκρισης σε παράγοντες καταπόνησης. Για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης για το φαγκρί χρειάζονται περαιτέρω έρευνες με άτομα υψηλής και χαμηλής απόκρισης.

Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης έχουν παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη για το είδος *Pagrus pagrus*, όπου εκτέθηκε για 5 λεπτά στον αέρα, τα οποία παρέμειναν αυξημένα και κατά το πέρασ του εικοσιτετραώρου ([M. Παυλίδης προσωπική επικοινωνία](#)). Η παρατεταμένη αύξηση της κορτιζόλης στην προηγούμενη μελέτη πιθανόν να οφείλεται στον διαφορετικό σχεδιασμό των πειραμάτων (έκθεση στον αέρα για 5 λεπτά έναντι αδειάσματος πολύ γρήγορα του ύδατος της δεξαμενής και αφήνοντας τα ζώα εκτεθειμένα εκτός ύδατος για 1 λεπτό, της παρούσης εργασίας), στην διαφορά θερμοκρασίας των πειραμάτων (21,6–23,3 έναντι 18±1°C, της παρούσης εργασίας) και την διαφορά μεγέθους των ζώων (371,7±58,6g έναντι 121,8±13,9g, της παρούσης εργασίας). Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης έχουν επίσης παρατηρηθεί στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio* (L)), μετά από περιορισμό σε δίχτυ (Ruane et al., 2002). Σε νεαρά άτομα του είδους *Sciaenops ocellatus*, μετά από σύλληψη, έκθεση στον αέρα για 2 λεπτά και μεταφορά σε άλλη δεξαμενή, η κορτιζόλη αυξήθηκε κατά 5 φορές, όπως και στην παρούσα μελέτη (Thomas and Robertson, 1991). Αντίθετα κατεβάζοντας το επίπεδο του ύδατος της δεξαμενής και στην συνέχεια επαναφέροντας το ήπια, δεν προκάλεσε μεταβολή στα επίπεδα κορτιζόλης στα νεαρά του είδους *Sciaenops ocellatus*, (Thomas and Robertson, 1991). Οι ερευνητές απέδωσαν την μη αύξηση της κορτιζόλης στο γεγονός ότι τα ψάρια αυτά είχαν υποστεί επανειλημμένως την διαδικασία και πιθανόν να είχαν εθιστεί στην καταπόνηση λόγω μειωμένης στάθμης του ύδατος. Η υπόθεση αυτή δεν ισχύει για τα άτομα των πειραμάτων της παρούσης εργασίας. Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, στα ίδια περίπου επίπεδα με το φαγκρί, παρατηρήθηκαν επίσης στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*)

που υπέστη περιορισμό για 15 λεπτά (Small., 2004). Αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης αναφέρονται και για το είδος *Acipenser medirostris* μετά από έκθεση στον αέρα για ένα λεπτό (Lankford et al., 2003) και την ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από σύλληψη σε δίχτυ και δόνηση (Gerwick et al., 1999). Το είδος *Brycon cephalus* αντίθετα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα κορτιζόλης μετά από σύλληψη και συνωστισμό για μικρό χρονικό διάστημα (da Rocha et al., 2004). Αύξηση στα επίπεδα της κορτιζόλης μετά από 90 δευτερόλεπτα χειρισμού εμφάνισαν και τα νεαρά άτομα ιριδιζουσας πέστροφας (*Salmo gairdneri*) (Barton et al., 1980).

Η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ αυξήθηκαν επίσης υπό την επίδραση οξείας καταπόνησης στο φαγκρί, ενώ δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην γλυκόζη μεταξύ μη καταπονημένων ατόμων και μη καταπονημένων που υπέστησαν μείωση του επιπέδου του ύδατος της δεξαμενής στο 1/3 με σιφόνι 15 λεπτά πριν τη δειγματοληψία. Το γαλακτικό οξύ φτάνει το μέγιστο μέσα στο πρώτο ημίωρο μετά το επεισόδιο οξείας καταπόνησης και στην συνέχεια μειώνεται σταδιακά για να φτάσει εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης στο πέρας του πρώτου εικοσιτετραώρου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και ~~στην~~σε προηγούμενη μελέτη με το είδος *Pagrus pagrus*, όπου εκτέθηκε για 5 λεπτά στον αέρα, όπου τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος παρέμειναν αυξημένα και 2 ώρες μετά αλλά μειώθηκαν μετά από 8 ώρες. Τα επίπεδα της γλυκόζης στην εν λόγω μελέτη αυξήθηκαν μετά από 2 ώρες και μειώθηκαν σημαντικά μετά από 24 ώρες (M. Παυλίδης προσωπική επικοινωνία).

Αυξημένα εμφανίσθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης και σε νεαρά άτομα του είδους *Sciaenops ocellatus*, μετά από σύλληψη, έκθεση στον αέρα για 2 λεπτά και μεταφορά σε άλλη δεξαμενή (Thomas and Robertson, 1991). Αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος, αλλά όχι και γλυκόζης, παρατηρήθηκαν στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) που υπέστη περιορισμό για 15 λεπτά (Small., 2004). Αύξηση των επιπέδων γλυκόζης και γαλακτικού οξέος αναφέρονται για το είδος *Acipenser medirostris* μετά από έκθεση στον αέρα για ένα λεπτό (Lankford et al., 2003). Το είδος *Brycon cephalus* δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης μετά από σύλληψη και συνωστισμό για μικρό χρονικό διάστημα (da Rocha et al.,

2004). Επίσης δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα της γλυκόζης αλλά ούτε και του γαλακτικού οξέος στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) που υπέστη περιορισμό για 45 λεπτά (Small., 2004). Η σχετιζόμενη με την καταπόνηση υπεργλυκαιμία μεσολαβείται κυρίως από τις επιδράσεις των κατεχολαμινών στην απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ, την κύρια αποθήκη υδατανθράκων στα ψάρια. Η κύρια διεργασία απελευθέρωσης γλυκόζης από το ήπαρ μέσω των κατεχολαμινών είναι η γλυκογενόλυση. Αντίστοιχα η οξεία καταπόνηση έχει συχνά σαν αποτέλεσμα ταχεία αύξηση στα επίπεδα γαλακτικού οξέος στους μυς και το πλάσμα, η οποία σχετίζεται με μαζική απελευθέρωση κατεχολαμινών και ακολουθούνται από ραγδαία αύξηση και των επιπέδων γλυκόζης.

Τα επίπεδα των κατεχολαμινών (E, NE) αυξήθηκαν σημαντικά υπό την επίδραση οξείας καταπόνησης στο φαγκρί, ενώ παρουσιάσθηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μη καταπονημένων ατόμων και μη καταπονημένων που υπέστησαν μείωση του επιπέδου του ύδατος της δεξαμενής στο 1/3 με σιφόνι 15 λεπτά πριν τη δειγματοληψία, τα οποία εμφάνισαν μειωμένες τιμές κατεχολαμινών. Η αναλογία E:NE ήταν περίπου 0,3. Μια υπόθεση για τις μειωμένες τιμές κατεχολαμινών που εμφανίζονται στα μη καταπονημένα άτομα που υπέστησαν μείωση του επιπέδου του ύδατος της δεξαμενής με σιφόνι, 15 λεπτά πριν τη δειγματοληψία, είναι η μειωμένη σχετικά καταπόνηση που υπέστησαν τα συγκεκριμένα άτομα κατά την διάρκεια της σύλληψης, μιας και αυτή ήταν ευκολότερη και ταχύτερη λόγω του μειωμένου όγκου ύδατος.

Οι ηλεκτρολύτες (K^{\pm} , Na^{\pm}), αυξάνονται κατά την επίδραση οξείας καταπόνησης στο φαγκρί. Τα ιόντα καλίου εμφανίζουν πολύ έντονη αύξηση στα καταπονημένα άτομα και μείωση σχεδόν κατά το ήμισυ στα μη καταπονημένα άτομα που υπέστησαν μείωση του επιπέδου του ύδατος της δεξαμενής, στο 1/3 του όγκου, με σιφόνι, 15 λεπτά πριν τη δειγματοληψία σε σύγκριση με τα μη καταπονημένα άτομα. Τα ιόντα νατρίου παρουσιάζουν επίσης αύξηση στα καταπονημένα άτομα. Τα επίπεδα των ιόντων νατρίου παρουσιάζονται αυξημένα και σε προηγούμενη μελέτη με το φαγκρί, σε αντίθεση με τα επίπεδα των ιόντων καλίου τα οποία δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην αρχή ενώ παρουσίασαν μείωση μετά από 8 ώρες (M. Παυλίδης προσωπική επικοινωνία). Οι

διαφορές πιθανόν να οφείλονται στον διαφορετικό σχεδιασμό των πειραμάτων, την διαφορά της θερμοκρασίας του ύδατος και του μεγέθους των ζώων μεταξύ των πειραμάτων των δύο εργασιών. Η αύξηση των ηλεκτρολυτών στον ορό του αίματος στα θαλασσινά είδη ιχθύων οφείλεται στην δράση της επινεφρίνης. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη εισροή ιόντων από τα βράγχια, μειωμένες απώλειες ιόντων από τα ούρα, συγκέντρωση λόγω απώλειας ύδατος από το αίμα. Ο κυριότερος παράγοντας είναι η αυξημένη εισροή ιόντων από τα βράγχια. Η επινεφρίνη αυξάνει την πίεση του αίματος με συνέπεια την αύξηση της διάχυσης από τα κανάλια ανάμεσα στα κύτταρα. Η αύξηση των ηλεκτρολυτών μπορεί να είναι παράγοντας καταπόνησης και να επιτείνει την αρχική απόκριση κορτιζόλης, με αποτέλεσμα επιπλέον αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης (Mc Donald and Milligan, 1997). Επίσης έχει αναφερθεί μη χοληνεργική συμπαθητική απελευθέρωση κατεχολαμινών, η οποία οφείλεται σε ενδοκρινικούς ή μη ενδοκρινικούς αιματολογικούς παράγοντες, όπως οι ίδιες οι κατεχολαμίνες, η κορτιζόλη, αυξημένα επίπεδα ιόντων καλίου και διοξειδίου του άνθρακα ή υποξεία (Randall and Perry, 1992).

Η κορτιζόλη έχει διεγερτική επίδραση στην βραγχιακή εξώθηση ιόντων νατρίου και χλωρίου, που είναι βασική για τον υδρομεταλλικό έλεγχο στο θαλάσσιο περιβάλλον (Wendelaar bonga, 1997). Η κορτιζόλη προάγει την διαφοροποίηση των κυττάρων χλωρίου, τους κυριότερους μεταφορείς ιόντων των βραγχίων και αυξάνει την ειδική δραστηριότητα των ιοντο-μεταφορικών ενζύμων, κυρίως της $\text{Na}^+-\text{Na}^+-\text{ATPάσης}$ στα βράγχια, το έντερο και τα νεφρά (Chester et al., 1980, McCormick, 1995).

Ο χρόνος προθρομβίνης μειώνεται στα καταπονημένα άτομα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, όπου ο χρόνος προθρομβίνης μειώνεται στα αναισθητοποιημένα άτομα και περισσότερο στα άτομα που αναισθητοποιήθηκαν με γαρυφαλέλαιο. ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο χρόνος προθρομβίνης μειώνεται σε απόκριση στην καταπόνηση.

Οι κατεχολαμίνες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση τόσο μεταξύ τους όσο και με την κορτιζόλη αλλά και την γλυκόζη κατά την οξεία καταπόνηση. Θετική

συσχέτιση παρουσιάζουν επίσης οι ηλεκτρολύτες μεταξύ τους και με την γλυκόζη. Αρνητική συσχέτιση παρουσιάζει η γλυκόζη με τον χρόνο προθρομβίνης, επιβεβαιώνοντας ξανά την υπόθεση ότι τα καταπονημένα άτομα έχουν ταχύτερο χρόνο πήξης του αίματος.

Στην παρούσα εργασία η πρωτογενής απόκριση των ψαριών στην **χρόνια καταπόνηση** με την μορφή **συνωστισμού** δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα επίπεδα κορτιζόλης και κατεχολαμινών δεν διαφέρουν μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν, αλλά η αναλογία E:NE ήταν κάτω του 0,1. Συνήθως αυξημένη ιχθυοφόρτηση έχει σαν αποτέλεσμα την καταπόνηση των ζώων και αυτό επηρεάζει τον μεταβολισμό (Montero et al., 1999, Vijayan et al., 1990), τον ανοσοποιητικό μηχανισμό (Rotllant et al., 1997, Tort et al., 1996, Yin et al., 1995) και την αύξηση (Procarione et al., 1999, Pickering & Stewart, 1984). Η ποσοτικοποίηση πάντως των χρόνιων συνθηκών καταπόνησης έχει αποδειχθεί δύσκολη, με πολλούς ερευνητές να αναφέρουν παροδική αύξηση στα επίπεδα της κορτιζόλης κατά την διάρκεια συνωστισμού (Ruane et al., 2002, Barcellos et al., 1999, Montero et al., 1999, Rotland and Tort, 1997, Tort et al., 1996, Yin et al., 1995), ενώ άλλοι έχουν αναφέρει μη επίδραση (da Rocha et al., 2004, Procarione et al., 1999, Cataldi et al., 1998, Kebus et al., 1992, Vijayan and Leatherland 1990) ή ακόμα και μείωση (Leatherland and Cho, 1985). Η καταλληλότητα της χρήσης της κορτιζόλης στην κυκλοφορία του αίματος σαν δείκτης χρόνιας καταπόνησης έχει αμφισβητηθεί (van Weerd and Komen, 1998). Οι αυξήσεις στα επίπεδα κορτιζόλης είναι πολύ χαμηλότερες κατά την διάρκεια καταπόνησης από συνωστισμό, παρά αυτές κατά την διάρκεια οξείας καταπόνησης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αρνητική ανάδραση του HPI άξονα (Rotllant et al., 2000) ή μπορεί να αντικατοπτρίζει αλλαγή στον μεταβολισμό και την κάθαρση της κορτιζόλης (Vijayan and Leatherland 1990). Οι Urbinati et al. (2003) παρατήρησαν μείωση των επιπέδων κορτιζόλης σε ψάρια που μεταφέρονταν σε υψηλότερες πυκνότητες. Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφηκαν και στο είδος *Salvelinus alpinus* (Jorgensen et al., 1993). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε ηρεμία, η έκκριση κορτιζόλης από τους νεφρικούς ιστούς *in vitro*, είναι αυξημένη σε ψάρια σε υψηλές πυκνότητες (Rotllant et al., 2000, Vijayan and Leatherland 1990)

Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης δεν διαφέρουν στις πυκνότητες εκτροφής που ελέγχθηκαν στο φαγκρί, ενώ οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος είναι αυξημένες στην ομάδα LDLV, δηλαδή στα άτομα που παρέμειναν σε χαμηλή πυκνότητα και χαμηλό όγκο ύδατος. Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης δεν βρέθηκαν να διαφέρουν σε προηγούμενη εργασία στο ίδιο είδος από τους Rotland and Tort (1997). Αυξήσεις στα επίπεδα της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος έχουν αναφερθεί στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), σε συνθήκες συνωστισμού (Ruane et al., 2002), ενώ οι (Ruane et al., 2003), δεν βρήκαν αλλαγές στην γλυκόζη στο ίδιο είδος. Επίσης στο είδος *Brycon cephalus*, δεν βρέθηκε αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης μετά από σύλληψη και σύντομο συνωστισμό (da Rocha et al., 2004). Το είδος *Acipenser naccarii*, επίσης δεν είναι ευπαθές στον συνωστισμό και δεν παρουσιάζει αλλαγές στην γλυκόζη και την κορτιζόλη (Cataldi et al., 1998). Παροδικές αυξήσεις κορτιζόλης και γλυκόζης έχουν αναφερθεί για πολλά είδη ιχθύων που υπέστησαν χρόνιο συνωστισμό, για μέρες (Tort et al., 1996, Yin et al., 1995). Νεαρά άτομα τιλάπιας (Auperin et al., 1997, Vijayan et al., 1997, Foo and Lam, 1993), του είδους *Micropterus salmoides* (Carmichael et al, 1984), του είδους *Hemigymnus melapterus* (Grutter and Pankurst, 2000), και της τσιπούρας *Sparus aurata* (Rotland et al., 2001), εμφανίζουν επίσης αλλαγές στην κορτιζόλη και την γλυκόζη του πλάσματος.

Οι τιμές του νατρίου είναι χαμηλότερες στην ομάδα LDLV, ενώ δεν διαφέρουν μεταξύ των HD και LD. Το κάλιο επίσης δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των ομάδων που ελέγχθηκαν, όπως και η οσμωτική πίεση και ο χρόνος προθρομβίνης.

Η ποσότητα μελανίνης στο δέρμα επίσης εμφανίζει αύξηση στην ομάδα LDLV, ενώ δεν διαφέρει μεταξύ των ομάδων HD και LD, υποδηλώνοντας ότι τα ζώα της ομάδας αυτής έχουν σκουρότερο χρώμα δέρματος. Οι συνιστώσες (L, a, b) του χρώματος δεν εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των ομάδων HD και LD, αποτελέσματα τα οποία είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελανίνης. Και πάλι όπως και στο πείραμα 1 (αναισθησία) τα μη αναισθητοποιημένα άτομα έχουν πιο φωτεινό χρώμα (μεγαλύτερες τιμές L) από τα αναισθητοποιημένα άτομα του φαγκριού.

Μια πιθανή εξήγηση των αντιφατικών αποτελεσμάτων που εμφανίζονται στις διάφορες δημοσιευμένες εργασίες ακόμα και για το ίδιο είδος είναι η παρακάτω:

Για την αλλαγή της πυκνότητας εκτροφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι εξής τρόποι: 1) αλλαγή του αριθμού των ατόμων στον ίδιο όγκο νερού (πείραμα 4.1), 2) αλλαγή του όγκου του νερού ή των διαστάσεων των δεξαμενών ή των ενυδρείων, διατηρώντας σταθερό τον αριθμό των ατόμων (πείραμα 4.2) και 3) συνδυασμός των δύο παραπάνω, δηλαδή αλλαγή και του αριθμού των ψαριών και του όγκου του νερού (πείραμα 4.3).

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης καθιστούν φανερό ότι δεν αρκεί ο χαρακτηρισμός της πυκνότητας εκφρασμένος σε kg/m^3 , για τον καθορισμό των επιπτώσεων αυτής στην φυσιολογική απόκριση των ψαριών.

Στο πείραμα 4.1, όπου η αλλαγή της πυκνότητας (5 και $25\text{kg}/\text{m}^3$) πραγματοποιήθηκε αλλάζοντας απλά τον αριθμό των ατόμων σε δεξαμενές με τον ίδιο όγκο νερού. φαίνεται ότι λιγότερα άτομα, σε χαμηλή πυκνότητα έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα και αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και ποσότητα μελανίνης στο δέρμα και χαμηλότερα επίπεδα νατρίου από τα περισσότερα άτομα, σε μεγαλύτερη πυκνότητα στον ίδιο όγκο ύδατος.

Αντίθετα στο πείραμα 4.2, όπου η αλλαγή της πυκνότητας (5 και $25\text{kg}/\text{m}^3$) πραγματοποιήθηκε αλλάζοντας απλά τον όγκο του ύδατος στις δεξαμενές, διατηρώντας σταθερό τον αριθμό των ατόμων. φαίνεται ότι ο ίδιος αριθμός ατόμων σε μεγαλύτερο και σε μικρότερο όγκο ύδατος, άρα και σε διαφορετική πυκνότητα, δεν παρουσιάζουν διαφορές στην φυσιολογική απόκριση.

Τέλος στο πείραμα 4.3, όπου η πυκνότητα είναι η ίδια ($5\text{kg}/\text{m}^3$) αλλά διαφέρει και ο αριθμός των ατόμων στις δεξαμενές και ο όγκος του ύδατος, φαίνεται ότι λιγότερα άτομα, σε χαμηλή πυκνότητα, έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα και αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και ποσότητα μελανίνης στο δέρμα και χαμηλότερα επίπεδα νατρίου από τα περισσότερα άτομα σε επίσης χαμηλή πυκνότητα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ο αριθμός των ατόμων (group size) που βρίσκονται σε συγκεκριμένο όγκο ύδατος έχει μεγαλύτερη επίδραση στις φυσιολογικές αποκρίσεις των ψαριών και όχι η πυκνότητα εκφραζόμενη εκφρασμένη σε kg/m^3 . Ο σχετικός όγκος, που υποδηλώνει τον όγκο που καταλαμβάνει ο πληθυσμός στο σύνολο του όγκου του ύδατος της δεξαμενής και

οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται, είναι η αιτία των διαφορετικών φυσιολογικών αποκρίσεων.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τον Rueda (2004) στο αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*), όπου σε πείραμα αντίστοιχο του 4.1 της παρούσης μελέτης βρήκε επίσης αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στην ομάδα με τα λιγότερα άτομα ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στην κορτιζόλη και την γλυκόζη. Σε πείραμα αντίστοιχο του 4.2 της παρούσης μελέτης βρήκε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στα άτομα με μικρότερο διαθέσιμο όγκο κολύμβησης και δεν παρατήρησε διαφορές στην γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ. Τέλος σε πείραμα αντίστοιχο του 4.3 της παρούσης βρήκε επίσης αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος στην ομάδα με τα λιγότερα άτομα ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στην κορτιζόλη και την γλυκόζη.

Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης που παρατηρήθηκαν από τον Rueda (2004) στο αντίστοιχο πείραμα του 4.2 της παρούσης μελέτης, πιθανόν να οφείλονται στον τρόπο μείωσης του διαθέσιμου όγκου κολύμβησης, ο οποίος επετεύχθη με την μορφή περιορισμού των ζώων, ο οποίος έχει αναφερθεί ως παράγοντας καταπόνησης σε διάφορα είδη, και όχι με την μείωση του όγκου του ύδατος της δεξαμενής, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη.

Παρόμοιες αποκρίσεις εμφανίζονται και σε άλλα είδη, όπου η μεγαλύτερη πυκνότητα δρα ευεργετικά επί της καταπόνησης και της αύξησης. Το είδος Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) παρουσιάζει συμπεριφορικές αποκρίσεις που σχετίζονται με την καταπόνηση σε χαμηλές πυκνότητες, η κατάσταση μετριάζεται καθώς η πυκνότητα αυξάνει και επανέρχεται όταν η πυκνότητα ξεπεράσει ένα ουδό. Οι Hecht and Uys (1997) επίσης έδειξαν ότι κάποια είδη κιχλιδών (cichlid) παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης με την αύξηση της πυκνότητας. Οι Rueda et al., επίσης έδειξαν ότι η αύξηση στο είδος *C. gariepinus* βελτιώθηκε σε υψηλότερες πυκνότητες σε σύγκριση με χαμηλότερες πυκνότητες.

Η φυσιολογική απόκριση των ψαριών στην χρόνια καταπόνηση σε ενυδρεία με διαφορετικές **θερμοκρασίες ύδατος** παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η καταλληλότερη θερμοκρασία εκτροφής είναι αυτή των 19°C, όπου τα επίπεδα γλυκόζης, γαλακτικού οξέος, κορτιζόλης και κατεχολαμινών είναι χαμηλά σε

σύγκριση με τις άλλες θερμοκρασίες, ενώ δεν παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα ηλεκτρολυτών και pH των μυών. Υπάρχει πιθανότητα ο HPI άξονας, όπως και άλλοι φυσιολογικοί μηχανισμοί, να έχει μια βέλτιστη θερμοκρασία, στην οποία η απόκριση του να είναι η πιο προσαρμόσιμη στον οργανισμό (Lankford et al., 2003). Για παράδειγμα, η αναπαραγωγική λειτουργία (Kelley et al., 1991), η καρδιο-αναπνευστική κατάσταση (Schreer et al., 2001) και η κολυμβητική ικανότητα (Myrick and Cech, 2000) έχουν βέλτιστα θερμοκρασιακά όρια στα ψάρια, τα οποία όταν υπερβληθούν, έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της λειτουργικότητας και την ανεπάρκεια. Στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), έχει παρατηρηθεί ότι προσαρμογή σε θερμοκρασιακή καταπόνηση προκαλεί επιβράδυνση στην ανάπτυξη των όρχεων, δια μέσου της κορτιζόλης (Goos and Consten, 2002).

Πιο αναλυτικά τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα στα ζώα της ομάδας T-15, πιθανόν λόγω μειωμένου μεταβολισμού. Μειωμένα επίπεδα γλυκόζης σε χαμηλή θερμοκρασία έχουν σημειωθεί και στο αργυρό γατόψαρο (*Rhamdia quelen*) το οποίο εγκλιματίσθηκε σε 15, 23 και 31°C για 21 μέρες, ενώ αντίθετα τα επίπεδα γλυκόζης αυξήθηκαν στην υψηλότερη των θερμοκρασιών (31°C) (Lermen et al., 2004). Αντίθετα από τα παραπάνω το γατόψαρο του είδους *Ictalurus punctatus*, παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στους 10°C σε σύγκριση με τους 20 και 30°C (Strange, 1980). Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και στο είδος *Ictalurus melas* (Ottolenghi et al., 1995). Οι Sun et al (1992, 1995) παρατήρησαν σημαντική υπεργλυκαιμία στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) σε θερμοκρασία 14-16°C μετά από 24 ώρες.

Τα επίπεδα γαλακτικού οξέος εμφανίζουν σημαντική αύξηση στα άτομα της ομάδας T-15. Ενώ αντίθετα τα επίπεδα γαλακτικού οξέος αυξήθηκαν στην υψηλότερη θερμοκρασία (31°C) στο αργυρό γατόψαρο (*Rhamdia quelen*) (Lermen et al., 2004).

Η επινεφρίνη δεν διαφέρει σημαντικά, ενώ η νορεπινεφρίνη παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση στα ζώα της ομάδας T-19 και στατιστικά σημαντική αύξηση στα άτομα της ομάδας T-25. Η αναλογία E:NE ήταν περίπου 0,3.

Η κορτιζόλη επίσης εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση στα άτομα της

ομάδας T-25, ενώ παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση στα ζώα της ομάδας T-15 με μικρή διαφορά από τα ζώα της ομάδας T-19. Παρόμοια αποτελέσματα με μείωση των επιπέδων κορτιζόλης σε χαμηλότερη θερμοκρασία (17 έναντι 25 °C) αναφέρονται στο είδος *Acipenser naccarii* (Cataldi et al., 1998). Στο αργυρό γατόψαρο (*Rhamdia quelen*) δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα της κορτιζόλης στις διάφορες θερμοκρασίες (15, 23 και 31°C) (Lermen et al., 2004), όπως επίσης και στο *Salmo clarki*, σε θερμοκρασίες 9 και 23 °C (Strange et al, 1977), αλλά και το χρυσόψαρο *Carassius auratus*, σε θερμοκρασίες 12 και 21 °C (Peter et al., 1978). Το ίδιο αναφέρεται και για το είδος *Acipenser medirostris*, σε θερμοκρασίες 11 και 19°C, με την διαφορά ότι η διάρκεια της απόκρισης ήταν μεγαλύτερη στους 11°C (Lankford et al., 2003). Αντίθετα στο γατόψαρο του είδους *Ictalurus punctatus*, παρουσιάστηκαν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης στους 10°C σε σύγκριση με τους 20 και 30°C (Strange, 1980).

Οι ηλεκτρολύτες στην παρούσα εργασία δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές σε αντίθεση με το είδος *Acipenser naccarii*, όπου ενώ τα επίπεδα των ιόντων καλίου εμφανίστηκαν μειωμένα στους 25 °C έναντι των 17 °C (Cataldi et al., 1998).

Το pH των μυών επίσης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη θερμοκρασιών.

Το χρώμα του δέρματος καταρχήν έρχεται σε συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα της παρούσης εργασίας με φωτεινότερα τα μη αναισθητοποιημένα άτομα και στις δύο περιοχές μέτρησης (ραχιαία και κοιλιακή). Επίσης τα μη αναισθητοποιημένα άτομα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις συνιστώσες L και b του χρώματος στην κοιλιακή πλευρά του σώματος, με αυξημένες τιμές του L στα άτομα της ομάδας T-19 (φωτεινότερο χρώμα) και αυξημένες τιμές του b στα άτομα της ομάδας T-25 (περισσότερη κίτρινη απόχρωση) και μειωμένες στα ζώα της ομάδας T-15 (λιγότερη κίτρινη απόχρωση). Τα αναισθητοποιημένα άτομα, παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις α και b συνιστώσες του χρώματος στην κοιλιακή πλευρά και στην b στην ραχιαία πλευρά του σώματος. Τα άτομα της ομάδας T-15 είχαν αυξημένο b (περισσότερη κίτρινη απόχρωση), ενώ τα άτομα της ομάδας T-19 είχαν μειωμένο b (λιγότερη κίτρινη απόχρωση) στην ραχιαία πλευρά του σώματος. Στην κοιλιακή πλευρά τα άτομα της ομάδας T-15 είχαν

αυξημένες τιμές α και b (περισσότερη κόκκινη και κίτρινη απόχρωση), ενώ τα άτομα της ομάδας T-19 είχαν μειωμένο α και b (λιγότερη κόκκινη και κίτρινη απόχρωση).

Το θερμικό σοκ φαίνεται να είναι περισσότερο καταπονητικό από το ψυχρό για το φαγκρί, όπως και το αργυρό γατόψαρο (*Rhamdia quelen*) (Lermen et al., 2004).

Η ποσότητα μελανίνης στο δέρμα, εμφανίζεται αυξημένη σημαντικά στα άτομα της ομάδας T-15 σε σχέση με τις άλλες ομάδες. Επιπλέον η ποσότητα μελανίνης στο δέρμα των ατόμων της ομάδας T-15, είναι μεγαλύτερη από τις τιμές εκκίνησης που έχουν οριστεί για το φαγκρί στην παρούσα μελέτη.

Η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους κατά την χρόνια καταπόνηση σε ενυδρεία και διαφορετικές θερμοκρασίες ύδατος. Οι κατεχολαμίνες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους, ενώ η επινεφρίνη παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με το κάλιο, όπως και το κάλιο με το pH των μυών.

Ο σχεδιασμός της παρούσας εργασίας έδωσε για πρώτη φορά την δυνατότητα καθορισμού τιμών εκκίνησης στο φαγκρί. Ως τιμές εκκίνησης επιλέχθηκαν εκείνες από τους λιγότερο επώδυνους χειρισμούς, οι οποίες ήταν και οι χαμηλότερες. Τα άνω και κάτω όρια του εύρους των τιμών εκκίνησης καθορίστηκαν από το 95% ($mean \pm 2SD$) των παραπάνω τιμών. Ο καθορισμός των τιμών εκκίνησης για κάθε είδος είναι θεμελιώδης, λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζουν οι αποκρίσεις στην καταπόνηση, προκειμένου να υπάρχει η δυνατότητα χαρακτηρισμού των ζώων ως καταπονημένων ή όχι σύμφωνα με αυτές τις τιμές ηρεμίας, αλλά και της σύγκρισης και συσχετισμού μεταξύ των αποκρίσεων σε διαφορετικούς χειρισμούς.



Συμπεράσματα

Τα **συμπεράσματα** που εξάγονται από την παρούσα μελέτη είναι:

Όσον αφορά στην **αναισθησία**, φαίνεται ότι το αναισθητικό 2-φαινοαιθανόλη συμβάλλει ελαφρώς αλλά όχι σημαντικά στην μετρίαση της πρωτογενής νευροενδοκρινικής απόκρισης στην καταπόνηση (κορτιζόλη, κατεχολαμίνες) στο φαγκρί. Αντιθέτως το γαρυφαλέλαιο δεν αποδεικνύεται αξιόπιστο αναισθητικό για το συγκεκριμένο είδος. Έτσι παρόλο που τα μη αναισθητοποιημένα άτομα του είδους, παρουσίασαν φωτεινότερο χρώμα δέρματος, η χρήση του αναισθητικού κατά την διάρκεια των χειρισμών επιβάλλεται κυρίως για ηθικούς λόγους και αποφυγή τραυματισμών.

Η **κορτιζόλη** αποδεικνύεται καλός δείκτης οξείας καταπόνησης με τιμές περίπου πενταπλάσιες από αυτές των μη καταπονημένων ατόμων,. Η κορτιζόλη αυξάνεται τις 2 πρώτες ώρες και μειώνεται στην συνέχεια για να φτάσει εντός των τιμών εκκίνησης στο πρώτο εικοσιτετράωρο μετά το επεισόδιο οξείας καταπόνησης. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν καθαρά ότι η κορτιζόλη δεν είναι κατάλληλος δείκτης χρόνιας καταπόνησης. Πιθανόν το φαγκρί να υφίσταται εθισμό στην καταπόνηση και απευαισθητοποίηση της απόκρισης κορτιζόλης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αρνητική ανάδραση του HPI άξονα ή μπορεί να αντικατοπτρίζει αλλαγή στον μεταβολισμό και την κάθαρση της κορτιζόλης. Επιπλέον οι τιμές της κορτιζόλης παρουσιάζουν μεγάλη τυπική απόκλιση μέσα στους πληθυσμούς γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση του διαχωρισμού των ατόμων φαγκριού σε ομάδες υψηλής και χαμηλής απόκρισης στην κορτιζόλη. Η παραπάνω υπόθεση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Από την άλλη πλευρά οι **κατεχολαμίνες** και ιδιαίτερα η νορεπινεφρίνη, εμφανίζεται καλός δείκτης οξείας αλλά και χρόνιας καταπόνησης, παρά τις δυσκολίες στον προσδιορισμό της. Αποδεικνύεται στην παρούσα μελέτη ότι με τον κατάλληλο σχεδιασμό των πειραμάτων και των χειρισμών κατά την δειγματοληψία, είναι δυνατόν να προσδιορισθούν με επιτυχία οι τιμές εκκίνησης των κατεχολαμινών. Οι κατεχολαμίνες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους αλλά και με την γλυκόζη και με την κορτιζόλη.

Η **γλυκόζη** επίσης αποτελεί αξιόπιστο δείκτη οξείας καταπόνησης με τιμές τριπλάσιες περίπου από τις τιμές των μη καταπονημένων ατόμων, ενώ δεν

συμβαίνει το ίδιο και για την χρόνια καταπόνηση, όπου επιδεικνύει μειωμένες τιμές στην θερμοκρασία των 15°C αλλά παραμένει πάντα εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης.

Το **γαλακτικό οξύ** αποδεικνύεται αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης, φτάνοντας στο μέγιστο μέσα στο πρώτο ημίωρο μετά το επεισόδιο οξείας καταπόνησης και στην συνέχεια μειώνεται σταδιακά για να φτάσει εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης στο πέρας του πρώτου εικοσιτετραώρου, αλλά και ο πλέον αξιόπιστος δείκτης χρόνιας καταπόνησης.

Οι **ηλεκτρολύτες** και κυρίως το κάλιο εμφανίζεται αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης, με πολύ αυξημένες τιμές στα καταπονημένα άτομα, αλλά όχι και χρόνιας καταπόνησης, όπου επιδεικνύουν μικρές διαφορές, αλλά παραμένουν πάντα εντός των ορίων των τιμών εκκίνησης. Οι ηλεκτρολύτες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους και με την γλυκόζη.

Ο **χρόνος προθρομβίνης** εμφανίζεται στην παρούσα μελέτη ως αξιόπιστος δείκτης οξείας καταπόνησης κατά την οποία τα επίπεδα του μειώνονται και εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της κορτιζόλης και της γλυκόζης.

Η **ποσότητα μελανίνης στο δέρμα** επίσης φαίνεται να συσχετίζεται με την χρόνια καταπόνηση, λόγω της αύξησης που παρουσιάζει και της συσχέτισης της με το γαλακτικό οξύ το οποίο αποδεικνύεται ο πλέον αξιόπιστος δείκτης χρόνιας καταπόνησης. Ένα άλλο συμπέρασμα, που εξάγεται από την παρούσα μελέτη και επιβεβαιώνει παλαιότερες μελέτες (Παυλίδης, προσωπική επικοινωνία), είναι ότι η ποσότητα μελανίνης στο δέρμα δεν συσχετίζεται με το χρώμα του δέρματος.

Το **χρώμα** του δέρματος επηρεάζεται από την θερμοκρασία του ύδατος και είναι φωτεινότερο στους 19°C. Επιπλέον σε όλα τα πειράματα της παρούσης μελέτης τα μη αναισθητοποιημένα άτομα του φαγκριού έχουν φωτεινότερο χρώμα δέρματος, επιδεικνύοντας αναμφισβήτητα την επίδραση της αναισθησίας στο χρώμα του δέρματος. Επιπλέον σε συνδυασμό με το πείραμα της πυκνότητας όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές υποδηλώνεται ότι η φωτεινότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης χρόνιας καταπόνησης.

Ένα επιπλέον συμπέρασμα που εξάγεται από την παρούσα μελέτη είναι ότι δεν αρκεί ο χαρακτηρισμός της **πυκνότητας** σε kg/m^3 , για τον καθορισμό των

επιπτώσεων αυτής στην φυσιολογική απόκριση των ψαριών. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο αριθμός των ατόμων (group size) έχει μεγαλύτερη επίδραση στις φυσιολογικές αποκρίσεις των ψαριών και όχι η πυκνότητα εκφρασμένη σε kg/m^3 . Ο σχετικός όγκος, που υποδηλώνει τον όγκο που καταλαμβάνει ο πληθυσμός στο σύνολο του όγκου του ύδατος της δεξαμενής και οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται, είναι η αιτία των διαφορετικών φυσιολογικών αποκρίσεων. Επιπλέον πειράματα σε επόμενες μελέτες θα καθορίσουν την υπόσταση και την ικανότητα του όρου αυτού να καλύψει το κενό που υπάρχει προς το παρόν στις μελέτες που ασχολούνται με την πυκνότητα. Επιπλέον το φαγκρί εμφανίζεται ανθεκτικό σε υψηλές πυκνότητες εκτροφής, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα για την καλλιέργεια του είδους. Υπάρχει όμως και η πιθανότητα οι πυκνότητες που χρησιμοποιήθηκαν να ήταν χαμηλές για το συγκεκριμένο είδος.

Επιπλέον από την παρούσα μελέτη φαίνεται η καταπόνηση του φαγκριού κατά την παραμονή του στα **ενυδρεία**, η οποία γίνεται φανερή από τις υψηλές τιμές των κατεχολαμινών και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος. Οι τιμές αυτές δεν οφείλονται στην καταπόνηση κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, καθώς ακολουθήθηκαν οι ίδιοι χειρισμοί με τα προηγούμενα πειράματα και επιπλέον η σύλληψη των ατόμων από τα ενυδρεία ήταν ακόμη ευκολότερη λόγω του σχήματος των ενυδρείων.

Τέλος η αφαίρεση του ύδατος της δεξαμενής με **σιφόνι** στο 1/3 του όγκου, 10-15 λεπτά πριν από την δειγματοληψία δεν φαίνεται να βοηθάει ιδιαίτερα στην μείωση της απόκρισης στην καταπόνηση, παρά μόνο να διευκολύνει τον χειριστή στην σύλληψη των ζώων. Σε ερευνητικό επίπεδο υπάρχει η πιθανότητα, σε περίπτωση που τα ψάρια υφίστανται συχνά τον χειρισμό αυτόν, να εθιστούν στην καταπόνηση λόγω μειωμένης στάθμης του ύδατος και αυτό να επηρεάσει τα αποτελέσματα εργασιών.



Βιβλιογραφία

- Ackerman, J.L., Bellwood, D.R., 2002. Comparative efficiency of clove oil and rotenone for sampling tropical reef fish assemblages. *J. Fish Biol.*, 60, 893-901.
- Adams, S.M., 1990b. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress in fish. *American fisheries society Symposium Series*, 8: 1-8.
- Ako, H., Tamaru, C.S., Bass, P. & Cheng-Sheng, L. (1994). Enhancing the resistance to physical stress in larvae of *Mugilcephalus* by the feeding of enriched *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, 122, 81-90.
- Almazan Rueda, P., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2004. Stocking density is not a proper parameter to define husbandry conditions in studies on welfare in *Clarias gariepinus*. In: Almazan Rueda, P. (Eds.), *Towards assessment of welfare in African catfish, Clarias gariepinus: the first step*. PhD thesis, Fish Culture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal sciences. Wageningen University, The Netherlands, pp.103-121.
- Almazan Rueda, A.P., 2004. *Towards assessment of welfare in African catfish, Clarias gariepinus: the first step*. PhD thesis, Fish Culture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal Sciences. Wageningen University, Netherlands.
- Andersen, D.E., Reid, S.D., Moon, T.W. & Perry, S.F., 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1811-17.
- Anderson, W.G., McKinley, R.S., Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North Am. Fish. Manage.* 17, 301-307.
- Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A., Prunet, P., 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormones and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 108, 35-44.
- Axelrod, J. & Reisine, T.D., 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224: 452-459.
- Barcellos L.J.G., Nicolaiewsky, S., de Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999, Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research* 30, 437-444.
- Barry, T.P., Malison, J.A., Held, J.A. & Parrish, J.J. (1995). Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 97, 57-65.
- Barry, T.P., Ochiai, M. & Malison, J.A. (1995). In vitro effects of ACTH on interrenal corticosteroidogenesis during early larval development in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 99, 382-87.

- Barton, B.A., Peter, R.E. & Paulencu, C.R., 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 805-811.
- Barton, B.A. and Peter, R.E., 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock. *J. Fish Biol.*, 20, 39-51.
- Barton, B.A., Schreck, C.B. & Sigismondi, L.A., 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile Chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 245-251.
- 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 Disease*, 1: 3-26.
- Barton, B.A., Schreck, C.B., Ewing, R.D., Hemmingsen, A.R. & Patino, R. (1985a). Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 59, 468-71.
- Barton, B.A. & Schreck, C.B. (1987b). Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116, 257-63.
- Beacham, T.D. & Evelyn, T.P.T. (1992). Genetic variation in disease resistance and growth of chinook, coho, and chum salmon with respect to vibriosis, furunculosis, and bacterial kidney disease. *Transactions of the American Fisheries Society*, 121, 456-85.
- Black, E.C., 1956. Appearance of lactic acid in the blood of Kamloops and lake trout following transportation. *Canadian Fish Culturist*, 18: 3-10.
- Black, E.C., 1957a. Alternations in the blood level of lactic acid in certain salmonid fishes following muscular activity. I. Kamloops trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 14: 117-134.
- Black, E.C., 1957b. Alternations in the blood level of lactic acid in certain salmonid fishes following muscular activity. II. Lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 14: 645-649.
- Black, E.C., 1957c. Alternations in the blood level of lactic acid in certain salmonid fishes following muscular activity. III. Sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 14: 807-814.
- Black, E.C., 1958. Hyperactivity as a lethal factor in fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 15: 573-586.

- Black, E.C & Barrett, I., 1957. Increase in levels of lactic acid in the blood of cutthroat and steelhead trout following handling and live transportation. *Canadian Fish Culturist*, 20: 13-24.
- Brett, J.R., 1958. Implications and assessment of environmental stress. In *The Investigation of Fish-Power Problems*. Larkin, P.A. (ed.): 69-83. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries. University of British Columbia, Vancouver.
- Broom, D.M., 1998. Fish welfare and the public perception on farmed fish. In: Report Aquavision 98. The second Nutreco aquaculture Business conference. Stanvagner forum, Norway. 13-15 May. Colin E.C., and Julien, V. ed. pp. 89-91.
- Brown, J.A., 1993. Endocrine responses to environmental pollutants. In: *Fish Ecophysiology*, ed. J.C. Rankin and F.B. Jensen. London: Chapman and Hall, pp. 276-296.
- Brown, J.A. & Whitehead, C. (1995). Catecholamine release and interrenal response of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to aluminium in acidic water. *Journal of Fish Biology*, 46, 524-35.
- Bry, C. (1982). Daily variations in plasma cortisol levels of individual female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. evidence for a post-feeding peak in well-adapted fish. *General and Comparative Endocrinology*, 48: 462-468.
- Burka, J.F., Hammel, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J., Spears, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture-a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20, 333-349.
- Carmichael, G.J., Tomasso J.R., Simco, B.A., Davis, K.B., 1984. Confinement and water quality-induced stress in largemouth bass. *Transaction of the American Society* 113, 767-777.
- Carmichael, G.J., Wedemeyer, G.A., McCraren, J.P. & Millard, J.L. (1983). Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Progressive Fish-Culturist*, 45, 110-13.
- Chanseau, M., Bosc, S., Galiay, E., Oules, G., 2002. The use of clove oil as an anesthetic for Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) and comparison of its effects with those of 2-phenoxyethanol. *Bull. Fr. Peche Piscic.* 365/366, 579-589.
- Chavin, W. & Young, J.E. (1970). Factors in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 33, 629-53.
- Chester J. I., Mosley, W., Henderson, I.W., Garland, H.O., 1980. The interrenal gland in pisces. In: *General Comperative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, ed. Chester J. I., Henderson, I.W.. London: Academic, vol. 3, pp 396-523.
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricane metanesuphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquac. Res.* 31, 537-546.

- Clearwater, J. S., Pankhurst, W. N., 1996. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroid and vitellogenic oocytes in the marine teleosts, red gurnard. *Journal of Fish Biology*, 50: 429-441.
- Colt J & Orwicz, K. (1991). Modeling production capacity in aquatic culture systems under freshwater conditions. *Aquacultural Engineering*, 10, 1–29.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of the cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* 86, pp.205-223.
- Cooke, J.S., Suski, C.D., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Wahl, D.H., 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* 239, 509-529.
- Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*, 5th edition. Edinburg, Churchill Livingstone. 1975.
- Davis, K.B. and Parker, N.C., 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 495-499.
- Davis B.K., Griffin, R.B., 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. *Aquaculture*, 233, 531-548.
- Davis B.K., Griffin, R.B., Gray, W.L., 2002. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture* 214, 55-66.
- da Rocha, M.R., Carvalho, G.E., Urbinati, C.E., 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxa *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquaculture Research*, 35, 245-249.
- De Smet, H. and Blust, R., 2001. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 255-262.
- Divanach P.; Kentouri M.; Charalambakis G.; Pouget F.; Sterioti A., 1993. Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self feeders. *Int. Conf. Bordeaux Aquaculture*, Bordeaux (France), 25-27 Mar 1992. Production, Environment and Quality. Ghent Belgium European Aquaculture Society. *Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.* 18: 285-297
- Duncan, I.J.H., Fraser, D., 1997. Understanding animal welfare. In *Animal Welfare*. Appleby M.C. and Hughes B.O. ed. Pp. 19-31. CAB International, Cambridge, UK.
- Ejike, C. & Schreck, C.B., 1980. Stress and social hierarchy rank in coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 109: 423-426.

- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N., North, B., Porter, M. Gadd, D., 2002. The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 61, pp.493-531.
- Ellis, T., Scott, A.P., Bromage, N., North, B., Porter, M. 2001. What is stocking density? *Trout News*, CEFAS-DEFRA, Publication no 32, pp.35-37.
- Ellis, A.E., 1981. Stress and modulation of defense mechanisms in fish. In *stress in fish*, Pickering, A.D. (ed.) pp. 147-169. Academic press, London.
- Endo, T., Ogihima, K., Tanaka, H., Oshima, S., 1972. Studies on the anesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. *Bull. Jpn. Sci. Fish.* 38, 761-767.
- FAO, 2002. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). FAO Rome, Italy.
- FAWC, 1996. Farmed Animal Welfare Council. Report on the welfare of farmed fish. London, Great Britain.
- Fevolden, S.E., Refstie, T. & Roed, K.H. (1991). Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 95, 53-65.
- Fevolden, S.E., Nordmo, R., Refstie, T. & Roed, K.H., 1993. Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) selected for high or low responses to stress. *Aquaculture*, 109: 215-224.
- Fevolden, S.E., Roed, K.H., Fjalestad, K.T., 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture* 205, 61-75.
- Fevolden, S.E., Roed, K.H. & Gjerde, B., 1994. Genetic components of poststress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance. *Fish and Shellfish Immunology*, 4: 507-519.
- Fjalestad, K.T., Gjedrem, T. & Gjerde, B. (1993). Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture*, 111, 65-74.
- Flos, R., Reig, L., Torres, P. and Tort, L., 1988. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 71: 99-106.
- Foo, J.T.W. & Lam, T.J., 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 145-158.
- Frisch, A. J. and Anderson, T. A., 2000. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 23-34.
- Gamperl, A.K., Vijayan, M.M. & Boutilier, R.G., 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 215-255.

- Gedamu L. and Zafarullah, M., 1993. Molecular analysis of rainbow trout metallothionein and stress protein genes: structure, expression and regulation. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, ed. P.W. Hochachka and T.P. Mommsen. Amsterdam: Elsevier, vol. 2, pp.241-258.
- Gerwick, L., Demers, E.N., Bayne, J.C., 1999. Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. *Comparative Biochemistry and Physiology* 124, 329-334.
- Gingerich, H.W. and Drottar, R.K., 1989. Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anesthesia and surgery. *General and comparative endocrinology*, 73, 390-397.
- Gjedrem, T., Salte, R. & Gjoen, H.M. (1991). Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*, 97, 1-6.
- Gjedrem, T. & Gjoen, H.M. (1995). Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to furunculosis, BKD and cold water vibriosis. *Aquaculture Research*, 26, 129-34.
- Goos, J.T.H. and Consten, D., 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197, 105-116.
- Grutter, A. S. and Pankhurst, N. W., 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*, 57: 391-401.
- Heath, D.D., Bernier, N.J., Heath, J.W. & Iwama, G.K., 1993. Genetic, environmental, and interaction effects on growth and stress response of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 435-442.
- Henderson, I.W. & Garland, H.O. (1980). The interrenal gland in pisces. Part 2. Physiology. In *General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, Volume 3. pp. 474-523. Academic Press, London.
- Hinkle, Jr., L.E., 1987. Stress and disease: the concept after fifty years. *Social Science and Medicine*, 25: 561-566.
- Hontela, A., Rismussen, J.B., Audet, C. & Chevalier, G. (1992). Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 278-83.
- Hunter, 1987. *Foundations of colloid science - R.J. HUNTER - Oxford University Press (1987)*.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, S.R., Eliassen, A.R., 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221, 549-566.

- Iwama, G.K., McGeer, J.C. & Bernier, N.J., 1992. The effects of stock and rearing history on the stress response in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). ICES Marine Science Symposium, 194: 67-83.
- Iwama, G.K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B., 1997. Fish stress and Health in Aquaculture. (ed). Cambridge university press.
- Janssens, P.A., and Waterman, j., 1988. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glucogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 91: 451-455.
- Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S. and Jobling, M., 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Aquaculture 110, 191-204.
- Kebus, M.J., Collins, M.T., Brownfield, M.S., Amundson, C.H., Kayes, T.B., Malison, J.A., 1992. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health 4, 1-6.
- Keene J.L., Noakes, D.L.G., Moccia R.D., Soto C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 29, 89-101.
- Kelley, C.D., Tamaru, C.S., Lee, C.S., Moriwake, A., Miyamoto, G., 1991. Effects of photoperiod and temperature on the annual ovarian cycle of the striped mullet, *Mugil cephalus*. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds), Proceedings of the Forth International Symposium of the Reproductive Physiology of Fish. FishSymp 91, Sheffield, UK, 142-144.
- Kenneth, B.D. and Griffin, B.R., 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. Aquaculture 233, 531-548.
- Kraul, S., Ako, H., Brittain, K., Cantrell, R. & Nagao, T. (1993). Nutritional factors affecting stress resistance in the larval mahimahi, *Coryphaena hippurus*. Journal of the World Aquaculture Society, 24, 186-93.
- Lall S P., Paterson, W.D., Hines, J.A. & Hines, N.J. (1985). Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon *Salmo salar* L, by dietary modification. Journal of Fish Diseases, 8, 113-24.
- Laidley C.W. and Leatherland, J.F., 1988. Circadian studies of plasma cortisol, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Biochem. 89, pp. 495-502.
- Lankford, E.S., Adams, E.T., Cech, J.J., Jr., 2003. Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. Comparative Biochemistry and Physiology 135A, 291-302.

- Laurent P. and Perry, S.F., 1989. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 250, pp, 429-442.
- Lawson, T.B., 1995. *Fundamentals of Aquaculture Engineering*. Chapman & Hall, New York, p.355.
- Leatherland, J. F., 1993. Stocking density and cohort sampling effects on endocrine interactions in rainbow trout. *Aquaculture International*, 1: 137-156.
- Leatherland, J. F., Cho, C.Y., 1985. Effects of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 27, 583-592.
- Lermen, L.C., Lappe, R., Crestani, M., Vieira, P.V., Gioda, R.C., Schetinger, C.M.R., Baldisserotto, B., Moraes, G., Morsch, V.M., 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 239, 497-507.
- Lymbery, P., 2002. In too deep-The welfare of intensively farmed fish: compassion in world farming report. Petersfield, Hampshire, England.
- Marking, L.L. and Meyer, F.P., 1985. Are better fish anaesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10 (6), 2-5.
- Maule, A.G. & Schreck, C.B. (1991). Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 84: 83-93.
- Mazeaud, M. M. & Mazeaud, F., 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: *Stress in fish*, Pickering, A. D. (ed.): 49-75. Academic Press, London.
- McDonald, D.G., and Milligan, C.L., 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In *Fish stress and Health in Aquaculture*. (ed). Cambridge university press.
- McDonald, D.G., and Milligan, C.L., 1992. Chemical properties of the blood. In *Fish physiology*, ed. W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell. San Diego, CA: Academic, vol XII, pp. 55-133.
- McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. In: *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation (Fish Physiology XIV)*, ed. C.M. Wood and T.J. Shuttleworth. San Diego, CA: Academic, pp. 285-315.
- Melotti, P., Roncarati, A., Garella, E., Carnevali, O., Mosconi, G. & Polzonetti-Magni, A. (1992). Effects of handling and capture stress on plasma glucose, cortisol and androgen levels in brown trout, *Salmo trutta morpha fario*. *Journal of Applied Ichthyology*, 8: 234-239.
- Mesa, M.G., 1994. Effects of multiple acute stressors on the predator avoidance ability and physiology of the juvenile Chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123: 786-793.

- Miles, H.M., Loehner, S.M., Michaud, D.T. & Salivar, S.L. (1974). Physiological responses of hatchery reared muskellunge (*Esox masquinongy*) to handling. Transactions of the American Fisheries Society, 103: 336-342.
- Moberg, G.P., 1985. Biological response to stress: key to assessment of well-being? In Animal stress. Moberg, G.P. (ed.): 27-49. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Mock, A. & Peters, G. (1990). Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. Journal of Fish Biology, 37: 873-885.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiol. Biochem. 20, 53-60.
- Mommsen, T.P., Walsh, P.J., Perry, S.F., and Moon, T.W., 1988. Interactive effects of catecholamines and hypercapnia on glucose production in isolated trout hepatocytes. Gen. Comp. Endocrinol. 70: 63-73.
- Morzel, M., Sohier, D., van de Vis, H., 2002. Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. Journal of the science of food and agriculture 82, 19-28.
- Munck, A., Guyre, P.M. & Holbrook, N.J., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocrine Reviews, 5: 25-44.
- Myrick, C.A. and Cech, J.J., 2000. Swimming performance of four California stream fishes: temperature effects. Environ. Biol. Fish 58, 289-295.
- Nickell, D. C., N. R. Bromage, 1998. The effect of timing and duration of feeding astaxanthin on the development and variation of fillet colour and efficiency of pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 169: 233-246.
- Nikinmaa, M., Soivio, A., Nakari, T. & Lindgren, S. (1983). Hauling stress in brown trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. Aquaculture, 34: 93-99.
- Nilsson, J., 1992. Genetic variation in resistance of Arctic char to fungal infection. Journal of Aquatic Animal Health, 4: 126-128.
- Noga, E. J., Kerby, J.H., King, W., Aucoin, D. P. & Giesbrecht, F., 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* X *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* x *Morone americana*). American Journal of Veterinary Research, 55, 405-409.

- Olla, B. L., Pearson, W. H. and Studholme, A. L., 1980a. Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment. *Rapports et Proces-Verbaux des Reunions Conseil International pour L'Exploration de la Mer*, 179 : 162-173.
- Olsen Y.A., Einarsdottir, I.E., Nilssen, K.J., 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture* 134, 155-168.
- Ottolenghi, C., Puviani, A.C., Ricci, D., Morsiani, E., 1995. The effect of high temperature on blood glucose level in two teleosts fish (*Ictalurus melas* and *Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A, 229-235.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2002. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 12: 1-12.
- Pankhurst, N.W., Van Der Kraak, G. & Peter, R.E. (1995). Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 99: 249-257.
- Pankhurst, N.W. & Dedual, M. (1994). Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate and gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 45: 1013-1025.
- Pavlidis, M., Berry, M., Kokkari, C. and Kentouri, M., 1999. Prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen values in Mediterranean marine teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21, 335-343.
- Pavlidis, M., Berry, M., Divanach, P. and Kentouri, M., 1997. Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquaculture International* 5, 237-247.
- Pavlidis, M., Greenwood, L., Paalavuo, M., Molsa, H., Laitinen, T.J., 1999. The effect of photoperiod on Diel Rhythms in Serum Melatonin, Cortisol, Glucose and Electrolytes in the Common Dentex, *Dentex dentex*. *General and Comparative Endocrinology*, 113, 240-250.
- Παπουτσόγλου, Σ. Ε, 1998. Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης.
- Peter, R.E., Hontela, A., Cook, F.A. and Paulencu, R.C., 1978. Daily cycles in serum cortisol levels in the goldfish: effects of photoperiod, temperature, and sexual condition. *Canadian Journal of Zoology* 56, 2443-2448.
- Peters, G. & Ouang Hong, L. (1984). The effect of social stress on gill structure and plasma electrolyte levels of European eels (*Anguilla anguilla* L.). *Verfahren Deutsch Zoologisch Gesellschaft*, 7, 318-22.

- Perry, S.F. & Reid, S.D. (1992). Relationship between blood O₂ content and catecholamine levels during hypoxia in rainbow trout and American eel. *American Journal of Physiology*, 263, R240-9.
- Perry, S.F. & Reid, S.D. (1993). Beta-adrenergic signal-transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish physiology and Biochemistry*, 11, 195-203.
- Pickering, A.D. (1989). Environmental stress and the survival of brown trout, *Salmo trutta*. *Freshwater Biology*, 21, 47-55.
- Pickering, A.D. (1992). Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100: 125-139.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G., 1995. Biochemical effects of stress. In: *Environmental and Ecological Biochemistry*, ed. P.W. Hochachka and T.P. Mommsen. Amsterdam: Elsevier, pp. 349-379.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 253-258.
- Pickering, A.D., Stewart, A., 1984. Acclimation of the interregal tissue of the brown trout *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. *J. Fish Biol.* 24,731-740.
- Pottinger, T.G., 1990. The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 78, 194-203.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.G., Appleby, A., Yeomans, W.E., 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *General and Comparative Endocrinology*, 120, 108-117.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.G., 1999a. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology*, 116, 122-132.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.G., 1999b. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture* 175, 351-363.
- Pottinger, T.G. & Mosuwe, E., 1994. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a 'critical period'. *General and Comparative Endocrinology*, 95, 350-362.
- Pottinger, T.G. & Pickering, A.D., 1990. The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 80, 264-73.

- Pottinger, T.G., Balm, P.H.M. & Pickering, A.D. (1995). Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 98, 311-20.
- Pottinger, T.G., Pickering, A.D. & Hurley, M.A., 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103, 275-89.
- Pottinger, T.G. and T.A. Moran. 1993. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology*. 43: 121-30
- Pottinger, T.G., Moran, T.A. & Morgan, J.A.W., 1994. Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress. *Journal of Fish Biology*, 44, 149-63.
- Post, G.B., 1987. *Text Book of Fish Diseases*. TFH Publications, Neptune, New Jersey, p.287.
- Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *N. Am.J.Aquacult.* 61, 91-96.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M. and Bonga, S.E.W., 1997. Interrenal Stress Responsiveness of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Is Impaired by Dietary Exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology*, 3: 472-482.
- Randall, D.J. & Perry, S.F., 1992. Catecholamines. In *Fish Physiology*, Volume 12. The Cardiovascular System. Randall, D.J. & Hoar, W.S. ed. Academic Press, New York.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120, 1-27.
- Reid, S.G., Furimsky, M., Perry, S.F., 1994. The effects of repeated physical stress or fasting on catecholamine storage and release in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *J. Fish Biol.* 45, 365-378.
- Rotllant, J. and Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Fish Biol.* 51, 21-28.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Perez-Sanchez, J., Wendelaar Bonga, S.E., Tort, L., 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and a melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 152-163.

- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Perez-Sanchez, J., Wendelaar Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333-342.
- Rotllant, J. and Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology* 51, 21-28.
- Ross, L.G. and Ross, B., 1999. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (2nd ed) Blackwell Science, Oxford, UK.
- Ruane N.M., Carballo, E.C., Komen, J., 2002. Increased stock density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L). *Aquaculture* 210, 245-257.
- Ruane, N. M., Nolan, D. T., Rotllant, J., Costelloe, J., Bonga S. E. W., 2000. Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor. *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 451-463.
- Roubach, R., Gomes, C.L., Lourenco, N.P.J., Fonseca, A.L.F., Santos, J.O.P., Val, L.A., 2003. Efficacy of eugenol as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*.
- Salonius, K. & Iwama, O.K. (1993). Effects of early rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance in juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 759-66.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, pp. 49-75.
- Schreer, j.f., Cooke, S.J., McKinley, R.S., 2001. Cardiac responses to variable forced exercise at different temperatures: an angling simulation for smallmouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.* 130, 783-795.
- Scherer, E., 1992. Behavioral responses as indicators of environmental alternations: approaches, results, developments. *Journal of Applied Ichthyology*, 8:122-131.
- Schreck, C.B. (1982). Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, 28, 241-49.
- Schreck, C.B., Jonsson, L., Feist, G. & Reno, P, (1995). Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture*, 135, 99-110.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32.
- Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667): 1383-1392.

- Selye, H., 1973. The evolution of the stress concept. *American Scientists*, 61: 692-699.
- Sheridan, K.L., 1988. Lipid dynamics of fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 90, pp. 679-690.
- Sheridan, M.A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 107, pp. 495-508.
- Shariff, M., Jayawardena, P. A. H. L., Yusoff, F. M., Subasinghe, R., 2001. Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 281-291.
- Shrimpton, J.M. & Randall, D.J. (1994). Downregulation of corticosteroid receptors in gills of coho salmon due to stress and cortisol treatment. *American Journal of Physiology*, 267, R432-438.
- Skjervold, P.O., Fjaera, S.O., Oestby, P.B., Einen, O., 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192, 265-280.
- Sigismondi, L.A. & Weber, L.G., 1988. Changes in avoidance response time of juvenile Chinook salmon exposed to multiple acute handling stresses. *Transactions of the American Fisheries Society*, 117: 196-210.
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use of anesthetics in red pacu (*Piaractus brachipomus*). *AJVR* 62 (3), 337-342.
- Sloman, A. K., Montpetit, J.C., Gilmour, M.K., 2002. Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 127: 136-146.
- Small, C.B., 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*, 238, 469-481.
- Smith, A. C., 1980. Formation of lethal blood clots in fish. *J. Fish Biol.* 16, 1-4.
- Smith, B. E., Hardy, R. W., Torrissen, O. J., 1992. Synthetic astaxanthin deposition in pan-size coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 104: 105-119.
- Soto C.G., Burhanuddin, 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136, 149-152.
- Stehly, G.R., Gingerich, W.H., 1999. Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquac. Res.* 30, 365-372.

- Stoskopf, M., 1993. Anaesthesia. In *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. (ed) Brown L., Pergamon Veterinary Handbook Series, London, UK. Pp. 161-168.
- Stouthart, A. J. H. X., Lucassen, E. C. H. E. T., Van Strien, F. J. C., Balm, P. H. M., Lock, R. A. C., and Bonga, S. E. W., 1998. Stress responsiveness of the pituitary-interrenal axis during early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Endocrinology*, 157: 127-137.
- Strange, R.J., 1980. Acclimation temperature influences cortisol and glucose concentrations in stressed channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109, 298-303.
- Strange, R.J., Schreck, C.B. & Ewing R.D., 1978. Cortisol concentrations in confined juvenile Chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 107: 812-819.
- Strange, R.J., Schreck, C.B. and Golden, T.J., 1977. Corticoid stress response to handling and temperature in salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society* 106, 213-218.
- Sufi, S.B., Donaldson, A., Jeffcoate, S.L., 1994. World Health Organization (WHO), Matched Reagent Programme Method Manual, 18th Edition.
- Sugimoto M. 1993a. Morphological color changes in the medaka, *Oryzias latipes*, after prolonged background adaptation: I. Changes in the population and morphology of melanophores. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A: 513-518.
- Sugimoto M. 1993b. Morphological colour changes in the medaka, *Oryzias latipes*, after prolonged background adaptation: II. Changes in the responsiveness of melanophores. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A: 519-523.
- Sun, L.T., Chen, G.R., Chang, C.F., 1992. The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures. *Journal of Thermal Biology* 17, 149-153.
- Sun, L.T., Chen, G.R., Chang, C.F., 1995. Acute responses of blood parameters and comatose effects in salt-acclimated tilapias exposed to low temperatures. *Journal of Thermal Biology* 20, 299-306.
- Thomas, P. and Robertson, L., 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96: 69-86.
- Tort L., Puigcerver, M., Crespo, S., Padros, F., 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquac. Res.*, 33, 907-910.
- Tort L., Sunyer, J.O., Gomez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51, 179-188.

- Trenzado, C.E., Carrick, T.R., Pottinger, T.G., 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology* 133, 332-340.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Landines, M.A., 2003. Loading and transport stress in juvenile matrinxa (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture* 229, 389-400.
- van der Boon J., van der Thillart, G.E.E.J.M. & Addink, A.D.F., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A, 47-53.
- Van Raaij, M.T.M., van den Thillart, G.E.E.J.M., Hallemeesch, M., Blm, P.H.M., and Steffens, A.B., 1995. Effect of arterially infused catecholamines and insulin on plasma glucose and free fatty acids in carp. *Am. J. Physiol.* 268 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 37): R1163-r1170.
- van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 120, 107-112.
- Vijayan, M.M., & Leatherland, J.F., 1990. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.* 124, 311-318.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S. & Leatherland, J.F., 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*, 82, 476-86.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G. and Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116, 89-95.
- Wald L. & Wilzbach, M.A., 1992. Interactions between native brook trout and hatchery brown trout: effects on habitat use, feeding, and growth. *Transactions of the American Fisheries Society*, 121, 287-96.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 3, pp. 591-625.
- Watten, B.I., 1992. Modeling the effects of sequential rearing on the potential production of controlled environment fish-culture systems. *Aquacultural Engineering*, 11, 33-46.
- Wedemeyer, G.A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 62. Cambridge University Press, UK, pp.35-71.
- Wedemeyer, G.A., 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman & Hall, ITP, New York, p232.

- Wedemeyer, G.A., 1996. Transportation and handling. In Principles of Salmonid Culture. Pennell, W. & Barton, B.A. (eds.) pp. 727-58. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Wedemeyer, G., 1996a. Physiology of Fish in Intensive Culture. Chapman & Hall, New York.
- Wedemeyer, G.A., 1996b. Handling and transportation of salmonids. In Principles of Salmonid Aquaculture. Pennell, W. & Barton, B. (eds.) Elsevier Publishing, Netherlands, in press.
- Wedemeyer, G.A. & McLeay, D.J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In Stress and Fish. Pickering, A.D. (ed.) pp. 247-75. Academic Press, London.
- Wilson, J.F. and Dodd, J.F., 1973. The role of melanophore-stimulating hormone in melanogenesis in the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L. J. Endocr. 58, 685-686.
- Witters, H.E., van Puymbroeck, S., Vandeborghet, O.L.J., 1991. Adrenergic response to physiological disturbances in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to aluminium at acid pH. Can. J. Fish Aquat. Sci. 48, pp. 414-420.
- Woodward, C.C & Strange, R.G., 1987. Physiological stress responses in wild and hatchery-reared rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society, 116, 574-579.
- Wooster G.A., Hsu, H-M., Bowser, P.R., 1993. A manual for nonlethal surgical procedures to obtain tissue samples for use in fish health inspections. Northeast Regional Aquaculture Center, USDA/CSREES Bulletin 112-1993.
- Woody, C.A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trials. J. Fish Biol. 60, 340-347.
- Yalow, R.S. and Benson, S.A., 1960. Immunoassay of endogenous insulin in man. J Clin Invest. 39, 1157-1175.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin Y.M.M., 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.), Fish and Shellfish Immunology 5, 519-529.