ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

Διιδρυματικό Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών

Περιβαλλοντική Βιολογία
ENVIRONMENTAL BIOLOGY

Οικογενειακές και ατομικές διαφορές σε μεταβολικούς δείκτες σε λαβράκι (*Dicentrarchus labrax L*)σε συνάρτηση με το στρες

Παπαναγιώτου Θεοδώρα

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης

Ηράκλειο, Μάιος 2021

Επιβλέπων καθηγητής: Παυλίδης Μιχαήλ, Καθηγητής

Τριμελής επιτροπή: Παυλίδης Μιχαήλ, Καθηγητής

Λύκα Κωνσταντία, Αν.Καθηγήτρια

Τσιγγενόπουλος Κων/νος, Ερευνητής Α΄

Στον προφήτη…..

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παυλίδη Μιχαήλ για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την υπομονή του για την υλοποίηση της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Θανάση Σαμαρά για την καθοριστική και πολύτιμη βοήθεια του, καθώς και όλη την ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας ιχθύων.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω ακόμη στην υποψήφια διδάκτωρ και αγαπημένη φίλη Μαρία Μαστοράκη για την απεριόριστη βοήθεια – υποστήριξη- συμπαράσταση.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω του πιο κοντινούς μου ανθρώπους, τον γιατρό μου, την αδερφή μου, τις φίλες μου και την οικογένεια μου για την εμψύχωση, την υποστήριξη και την συμπαράσταση.

Σας ευχαριστώ πολύ!

Περίληψη

Η ευημερία (welfare) των εκτρεφόμενων ψαριών απασχολεί όλο και περισσότερο την επιστημονική κοινότητα, θέλοντας να εξασφαλίσει καλύτερες και ιδανικότερες συνθήκες διαβίωσής. Στα πλαίσια των εντατικών εκτροφών, διάφοροι παράγοντες, όπως φυσικοί, χημικοί , διαχειριστικοί, μπορούν να προκαλέσουν καταπόνηση (stress) στους οργανισμούς, η οποία αποτελεί την κύρια πηγή διατάραξης στην ευζωία των ιχθύων.

Η παρούσα εργασία έχει ως κύριο σκοπό την διερεύνηση μεταβολικών δεικτών (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, ολικές πρωτεΐνες, γαλακτικό οξύ, κορτιζόλη, ωσμωτική πίεση, μαγνήσιο, χλώριο και αλβουμίνη) στο λαβράκι σε συνάρτηση με το γενετικό υπόβαθρο και το στρες, την εξέταση της σταθερότητας στην απόκριση στο στρες (z-scores) καθώς και την ταυτοποίηση ατόμων με σταθερά υψηλή και χαμηλή απόκριση για κάθε δείκτη χωριστά.

Αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο λαβράκι, σε 20 διαφορετικές οικογένειες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε οξύ στρες (acute stress) σε 3 διαφορετικές χρονικές στιγμές, σε διάστημα 20 ημερών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι βιοχημικοί δείκτες, πλην της αλβουμίνης, επηρεάστηκαν σημαντικά ($p<0,05$) από τις δειγματοληψίες στρες, ενώ η απόκριση της χοληστερόλης, των τριγλυκερίδιων και της κορτιζόλης αποτέλεσε ένδειξη της επίδρασης του γενετικού υπόβαθρου.

Η επαναληπτικότητα που παρατηρήθηκε σε όλες τις μεταβλητές, πλην του Mg, αποδεικνύει ότι κάθε μεταβλητή αποτελεί ένα σταθερό ατομικό χαρακτηριστικό, συμβάλλοντας έτσι στην περαιτέρω διάκριση των ψαριών, σε άτομα με συνεχή υψηλή (HR) ή χαμηλή (LR) απόκριση, μετά την έκθεση σε οξύ στρες.

Από μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, προκύπτει το γεγονός ότι άτομα του ίδιου είδους μπορεί να έχουν σταθερά αποκλίνουσες φυσιολογικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα ή στρεσσογόνο παράγοντα. Ο προσδιορισμός ενδο-ειδικών διαφορών στην απόκριση των μεταβολικών δεικτών, καθώς και η κατανόηση των επιπτώσεων τους στην απόδοση και τη φυσική κατάσταση των εκτρεφόμενων ψαριών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ιδανικότερων συνθηκών διαβίωσής.

Τέλος, η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA), μετά την επεξεργασία όλων των υπό μελέτη βιοχημικών παραμέτρων, συνέβαλε τόσο στην επιλογή των κύριων μεταβλητών, όσο και στην συνολική τους απεικόνιση. Συγκεκριμένα, η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, οι ολικές πρωτεΐνες και η γλυκόζη εξηγούν το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας, ενώ ο παράγοντας οικογένεια δεν φάνηκε να έπαιξε σημαντικό ρόλο.

Λέξεις κλειδιά

Μεταβολικός δείκτης, Στρες, Ευημερία, Ευζωία, *Dicentrarchus labrax*

Περιεχόμενα

Εισαγωγή 7
Dicentrarchus labrax 9
Υλικά και μέθοδοι 10
Στατιστικά ανάλυση 11
Αναλυτικοί προσδιορισμοί 12
Αποτελέσματα 14
Απόκριση βιοχημικών παραμέτρων σε οξύ στρες και η σχέση των οικογενειών 14
Συσχέτιση παραμέτρων 24
Επαναληπτικότητα και ταυτοποίηση LR και HR ατόμων 26
Ανάλυση κύριων συνιστωσών 27
Ανάπτυξη μεταβολικού δείκτη 28
Συζήτηση-Συμπεράσματα 29
Βιβλιογραφία 32

Εισαγωγή

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων στον κόσμο. Συγκεκριμένα, παρέχει το 50% του συνόλου των ψαριών που καταναλώνονται παγκοσμίως σήμερα και προβλέπεται ότι μέχρι το 2030 θα είναι η πρωταρχική πηγή ψαριών (FAO 2016).

Η εξασφάλιση της επάρκειας τροφίμων σε ένα πληθυσμό που θα ξεπερνά τα 9 δισ. μέχρι το 2050 παραμένει σύμφωνα με τον παγκόσμιο Οργανισμών Τροφίμων μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις. Η πρόκληση αυτή γίνεται ακόμα πιο σύνθετη αν λάβουμε υπόψη τις προκλήσεις της κλιματικής αλλαγής αλλά και τον κίνδυνο εξάντλησης των φυσικών πόρων. Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί λύση στην αντιμετώπιση της πρόκλησης συμβάλλοντας τόσο στην εξασφάλιση της επάρκειας τροφίμων όσο και στην οικονομική ευημερία μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων, ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής και της Ασίας.

Το 2018 η παραγωγή προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως σημείωσε νέο ρεκόρ και ανήλθε σε 211,9 εκ. τόνους εκ των οποίων το 54% προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 46% από την αλιεία. Συγκεκριμένα, τα ψάρια αποτέλεσαν το μεγαλύτερο όγκο παραγωγής, με κυριότερο είδος τον κυπρίνο, *Ctenopharyngodon idellus*, ενώ τα υδρόβια φυτά, τα μαλάκια και τα καρκινοειδή να τα ακολουθούν.

Σε όλες τις γεωγραφικές περιφέρειες, με εξαίρεση την Ωκεανία, παρατηρήθηκε αύξηση παραγωγής της υδατοκαλλιέργειας, με την Ασία να παράγει περίπου το 92% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ η Αμερική, η Ευρώπη, η Αφρική και η Ωκεανία να κατατάσσονται στις επόμενες θέσεις αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO, στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη ως προς τον όγκο και την αξία τους είναι τα ψάρια ακολουθούμενα από τα μύδια, ενώ τα υπόλοιπα είδη (φύκια, ασπόνδυλα, κλπ.), αποτελούν ένα πάρα πολύ μικρό ποσοστό της παραγωγής. Συγκεκριμένα, ο όγκος παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας το 2018 ανήλθε σε 695.885 τόνους αξίας 3,2 δισ. ευρώ, αντιπροσωπεύοντας αντίστοιχα το 51% ως προς τον όγκο και το 74,4% ως προς την αξία της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. αντίστοιχα. Σε σχέση με το προηγούμενο έτος η παραγωγή ψαριών υδατοκαλλιέργειας παρουσιάζει μείωση 4,9% ως προς τον όγκο και 0,3% ως προς την αξία. Ο όγκος παραγωγής οστράκων ανήλθε σε 667.934 τόνους αξίας 1.107,7 εκ. ευρώ, αντιπροσωπεύοντας το 49% και το 25,4% ως προς τον όγκο και την αξία της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. αντίστοιχα. Σε σχέση με το προηγούμενο έτος η παραγωγή μαλακίων υδατοκαλλιέργειας είναι αυξημένη κατά 6,6% ως προς τον όγκο και κατά 15,2% ως προς την αξία.

Συγκεκριμένα, τα κυριότερα είδη στην Ε.Ε, είναι το μύδι, ο σολομός Ατλαντικού και η ιριδίζουσα πέστροφα, ενώ η τσιπούρα και το λαβράκι κατατάσσονται στην 7η και 8η θέση.
Ως προς τον συνολικό όγκο παραγωγής υδατοκαλλιέργειας, στις τρεις πρώτες χώρες βρίσκονται η Ισπανία, το Ην. Βασίλειο και η Γαλλία, ενώ η Ελλάδα κατατάσσεται στην 5η θέση, παρουσιάζοντας αύξηση κατά 5,47% σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Ως προς την

αξία παραγωγής, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γαλλία και η Ελλάδα, η οποία παρουσίασε αύξηση3,4% σε σχέση με το προηγούμενο έτος, καταλαμβάνουν τις τρεις πρώτες θέσεις. Ωστόσο, η Ελλάδα βρίσκεται στην δεύτερη θέση, μετά το Ην. Βασίλειο, ως προς το συνολικό όγκο παραγόμενων ψαριών.

Στην Ελλάδα η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους της πρωτογενούς ζωικής παραγωγής λόγω της συμβολής του στην οικονομική ανάπτυξη και την κοινωνική συνοχή της χώρας. Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του

FAO, εκτιμάται πως το 63% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 37% από τη συλλεκτική αλιεία, αναφέροντας ενδεικτικά πως το 1980 μόλις το 2% της εγχώριας προσφοράς αλιευτικών προϊόντων προερχόταν από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 98% από τη συλλεκτική αλιεία.

Αναλυτικότερα, στις ελληνικές θάλασσές εκτρέφονται μεσογειακά είδη κυρίως τσιπούρα και λαβράκι και σε ένα μικρότερο ποσοστό «νέα είδη» όπως μυτάκι, *Diplodus puntazzo*, φαγκρί, *Pagrus pagrus*, λυθρίνι, *Pagellus erythrinus*, κρανιός, *Argyrosomus regius*, συναγρίδα, *Dentex dentex* και μαγιάτικο, *Seriola dumerili*. Το 1985 υπήρχαν 12 μονάδες με συνολική παραγωγή περίπου 100 τόνους, ενώ σήμερα έχουν ξεπεράσει τις 300 μονάδες, με παραγωγή των 100.000 τόνων. Η 2η πιο σημαντική κατηγορία εκτροφής είναι η οστρακοκαλλιέργεια, δραστηριότητα που πραγματοποιείται κυρίως σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας όπου εκτρέφεται σχεδόν αποκλειστικά το Μεσογειακό μύδι. Εκτός από τις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες, ιδιαίτερη θέση κατέχει η υδατοκαλλιέργεια των εσωτερικών υδάτων καθώς αποτελεί μια παραδοσιακή μορφή πρωτογενούς παραγωγής και πηγή κύριας ή συμπληρωματικής απασχόλησης και εισοδήματος για τους κατοίκους ορεινών και απομακρυσμένων ηπειρωτικών περιοχών. Σήμερα δραστηριοποιούνται 85 μονάδες εντατικής εκτροφής ιχθύων, με κυριότερο είδος την ιριδίζουσα πέστροφα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται ο κυπρίνος και το ευρωπαϊκό χέλι.

Συγκεκριμένα, η εκτροφή θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων το 2019 αντιπροσώπευσε το 83,8% του όγκου και το 97% της αξίας της συνολικής παραγωγής της χώρας. Τα κύρια είδη που εκτρέφονται είναι η τσιπούρα, *Sparus aurata* και το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* αποτελώντας περίπου το 96% των πωλήσεων, ενώ σε πολύ μικρότερη κλίμακα, περίπου 4%, εκτρέφονται όλα τα υπόλοιπα μεσογειακά είδη, όπως το λυθρίνι ,ο κρανιός και η συναγρίδα. Το 2019 η συνολική παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε στους 149.975 τόνους αξίας 564,6 εκ. ευρώ παρουσιάζοντας αύξηση 2% ως προς τον όγκο και σχεδόν 5% ως προς την αξία παραγωγής σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Παράλληλα, η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 120.500 τόνους (65.300 τόνοι τσιπούρας και 55.200 τόνοι λαβρακιού) συνολικής αξίας 545,6 εκ. ευρώ. Σε σχέση με το 2018 παρατηρείται αύξηση σχεδόν 3% ως προς τον όγκο παραγωγής (λόγω της αυξημένης παραγωγής λαβρακιού) και οριακή μείωση 1% ως προς την αξία πωλήσεων λόγω της μειωμένης τιμής και για τα δύο είδη. Η τσιπούρα αντιστοιχεί στο 54% του όγκου παραγωγής και το λαβράκι στο 46%.Ανα είδος, η παραγωγή τσιπούρας παρουσίασε αύξηση 4,6% και του λαβρακιού 4,1% σε σχέση με το προηγούμενο έτος.

Dicentrarchuslabrax

Η ταξινόμησή του είδους είναι η ακόλουθη:

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Συνομοταξία: Χορδωτά (Chordate)

Ομοταξία: Ακτινοπτερύγια (Actinopterygii)

Τάξη: Περκόμορφα (Perciformes)

Οικογένεια: Μορονίδες (Moronidae)

Γένος: *Dicentrarchus*

Είδος: *Dicentrarchuslabrax*

Το λαβράκι είναι ένα παράκτιο είδος που ζει σε ρηχά νερά (>100 m) και απαντάται στον Ατλαντικό ωκεανό, τη Μεσόγειο και την Μαύρη θάλασσα. Είναι ευρύαλο (0 – 40 ppt) και ευρύθερμο (2 – 32°C) είδος. Τα νεαρά άτομα ανιχνεύουν την τροφή τους σε εκβολές ποταμών και σε λιμνοθάλασσες, από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο, ενώ τα ενήλικα άτομα κατά τη διάρκεια του χειμώνα μεταναστεύουν σε βαθύτερα περιβάλλοντα, καθώς οι θερμοκρασίες είναι πιο σταθερές (9 – 10°C). Η αναπαραγωγική περίοδος του στη Μεσόγειο διαρκεί από τον Δεκέμβριο μέχρι τον Μάρτιο, ενώ στον Ατλαντικό από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο.

Επιπλέον, το *D. labrax* είναι οπορτουνιστικό είδος και ανάλογα με το αναπτυξιακό του στάδιο τρέφεται με πλαγκτόν (νυμφικό στάδιο), καρκινοειδή και ψάρια (τα ιχθύδια και τα ενήλικα άτομα) (Vandeputte et al., 2019).

Σήμερα, το Ευρωπαϊκό λαβράκι αποτελεί είδος σχεδόν αποκλειστικά προερχόμενο από τις ιχθυοκαλλιέργειες, ενώ η συμβολή της αλιείας στην παραγωγή του είναι αρκετά περιορισμένη. Συγκεκριμένα, το 2016 τα εκτρεφόμενα άτομα αποτελούν το 96% της συνολικής παραγωγής του(FAO 2018). Σε αντίθεση με την αλιεία, η εκτροφή του*D. labrax* γίνεται σε περιοχές της Μεσογείου, κυρίως στην Ισπανία, Ελλάδα, Τουρκία και Αίγυπτο.

Αναλυτικότερα, το λαβράκι είναι το πρώτο είδος, το οποίο δεν ανήκει στην οικογένεια των Σολομονίδων, και καλλιεργείται εμπορικά στην Ευρώπη (Bagni et al., 2005). Συγκεκριμένα, το 1970, γίνονται οι πρώτες προσπάθειες εντατικής εκτροφής του με τη χρήση άγριων ιχθυδίων. Στην συνέχεια, η ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών επέτρεψαν την ελεγχόμενη αναπαραγωγή και την εκτροφή των ιχθυδίων, γεγονός που συνέβαλε τόσο στην αύξηση της παραγωγής, όσο και την εξημέρωση των ψαριών. Τέλος, το 1990, η χρήση γεννητόρων, οι οποίοι γεννήθηκαν σε εκκολαπτήρια και μεγάλωσαν σε συνθήκες εκτροφής, ήταν πλέον εφικτή (Vandeputte et al., 2019).

Το γεγονός ότι το *D. labrax* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά εκτρεφόμενη είδη στην Ευρώπη οφείλεται αφενός στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που φέρει: γρήγορο ρυθμό

αύξησης, εύκολη προσαρμογή σε συνθήκες εκτροφής, υψηλή εμπορική αξία, ποιότητα της σάρκας, διαθεσιμότητα των νεαρών ιχθυδίων, μεγάλο μέγεθος που επιτρέπει την επεξεργασία (φιλέτο, φέτα, καπνιστό, κατεψυγμένο) και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Islam et al., 2020), αφετέρου δε στη σημαντική οικονομική επένδυση στον τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών, την απόκτηση επιστημονικής γνώσης πάνω στη βιολογία των ζωικών οργανισμών και την ανάπτυξη μεθόδων αναπαραγωγής, αύξησης και θρέψης (Zanuy et al.,2001).

Στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια πολλές διαχειριστικές πρακτικές όπως η μεταφορά, ο εμβολιασμός μπορεί να επάγουν στρες στους εκτρεφόμενους οργανισμούς, εφόσον χαρακτηρίζονται από μεγάλη διάρκεια και ένταση, επηρεάζοντας αρνητικά την ευημερία των ψαριών σε βάθος χρόνου. Η ευημερία των εκτρεφόμενων ψαριών ισοδυναμεί με την βέλτιστη δυνατή παραγωγή αντίστοιχα με χερσαία εκτρεφόμενα είδη. Επομένως η μελέτη της επίπτωσης των πρακτικών αυτών στην ευημερία τους είναι εξαιρετικά σημαντική για την εξαγωγή δεδομένων και προτάσεων για τις βέλτιστες διαχειριστικές πρακτικές (Maricchiolo et al., 2008).

Σε αυτό το πλαίσιο η γνώση της φυσιολογίας του στρες είναι σημαντική ώστε να κατανοήσουμε τον τρόπο απόκρισης τους σε στρεσσογόνους παράγοντες και να εξηγήσουμε την βιολογική σημασία της ενδοειδικής διακύμανσης που παρατηρείται σε αυτές τις αποκρίσεις (Samaras et al., 2016).

Παράλληλα η υγεία, η φυσική κατάσταση και κατ' επέκταση η ευημερία των εκτρεφόμενων ψαριών παραμείνει εξίσου σημαντική για την Ευρωπαϊκή βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας.

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να απαντήσει σε τέσσερα βασικά ερωτήματα:

- Μπορούν να αναπτυχθούν μεταβολικοί δείκτες ευζωίας στο λαβράκι?
- Υπάρχουν διαφορές των μεταβολικών δεικτών σε επίπεδο οικογένειας ?
- Υπάρχουν διαφορές των μεταβολικών δεικτών σε ατομικό επίπεδο ?
- Το stress μπορεί να επηρεάσει τους μεταβολικούς δείκτες ?

Υλικά και μέθοδοι

Όλη η πειραματική διαδικασία διεξάχθηκε στις εγκαταστάσεις του Νηρέα Α.Ε. Οι εργαστηριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Το δείγμα πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν 20 οικογένειές, εκ των οποίων οι 10 οικογένειες με υψηλά και 10 με χαμηλά αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά (breeding value). Η κάθε οικογένεια αποτελούνταν από 20 άτομα. Σε κάθε δεξαμενή τοποθετήθηκε ένα ψάρι από κάθε οικογένεια (20 άτομα/δεξαμενή). Συνολικά ο αριθμός των ψαριών ήταν 372 με μέσο βάρος 54,1 (± 2,4)g.

Για τον προσδιορισμό των τιμών βάσης και των ανοσολογικών δεικτών, πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου του στρες, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αίματος όλων των ψαριών χωρίς την έκθεσή τους σε οξύ στρες. Κατά την πρόκληση του στρες, η στάθμη του νερού της δεξαμενής μειώθηκε, τα άτομα καταδιώχτηκαν για 5min με απόχη και στην συνέχεια έμειναν περιορισμένα για 30min. Κατόπιν, τα ψάρια συλλήφθηκαν (t=0) με απόχη και αφού αναισθητοποιήθηκαν (2-phenoxyethanol) πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την ουραία φλέβα. Το πρωτόκολλο αυτό πραγματοποιήθηκε 3 φορές, σε διάστημα 20 ημερών, ιδανικός χρόνος για την πλήρη ανάκαμψη των ψαριών.

Σε όλες τις δειγματοληψίες καταγράφηκαν το βάρος, η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ, η κορτιζόλη, η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, οι ολικές πρωτεΐνες, η αλβουμίνη, η ωσμωτική πίεση, το μαγνήσιο και το χλώριο.

Στατιστικά ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SigmaStat 3.1 και R.Σε περίπτωση που ήταν απαραίτητο έγινε μετασχηματισμός των τιμών σε λογαριθμικές (log10). Στα δεδομένα, εφόσον ελέγχθηκε η κανονικότητα κατανομής και η ισότητα των διασπορών, έγινε έλεγχος με ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανομένων μετρήσεων (Two way repeated measures analysis of variance, ANOVA) και χρησιμοποιήθηκε το Holm-Sidak τεστ πολλαπλής σύγκρισης, καθώς Ιεραρχική Ανάλυση Διασποράς(nested ANOVA).

Για να αποφευχθούν οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των μεταβλητών μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών, οι συγκεντρώσεις σταθμίστηκαν για κάθε δειγματοληψία με τη χρήση των Z-scores. Με τον τρόπο αυτό οι τιμές των συγκεντρώσεων για κάθε μεταβλητή ξεχωριστά ανά άτομο, σταθμίστηκαν ως προς το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά, μέσω του τύπου:

$$Z_i = \frac{x_i - x_a}{S}$$

Όπου το Z_iZ-score ενός ατόμου i σε μία δειγματοληψία,X_i η συγκέντρωση της μεταβλητής του ατόμου i, ο μέσος όρος συγκεντρώσεων της μεταβλητής όλων των ατόμων του δείγματος και s η τυπική απόκλιση των ατόμων του δείγματος για τη συγκεκριμένη δειγματοληψία.

Η επαναληπτικότητα (repeatability) της απόκρισης των βιοχημικών μεταβλητών υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$r = S_A^2/(S^2 + S_A^2)$$

Ο συντελεστής επαναληπτικότητας εκφράζει το ποσοστό διακύμανσης του δείγματος που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των ατόμων και όχι σε διαφορές μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων του ίδιου ατόμου.

Η σταθερότητα απόκρισης κάθε ατόμου στις τρεις δειγματοληψίες στρες εξετάστηκε από την Ιεραρχική Ανάλυση Διασποράς (nested ANOVA), στην οποία ο παράγοντας άτομο (individual) εντάσσεται στον παράγοντα οικογένεια (Family).

Στη συνέχεια, για κάθε άτομο υπολογίστηκε το αθροιστικό Z-score ($Zsum$) προσθέτοντας τα επιμέρους κάθε δειγματοληψίας.Τα άτομα με υψηλή απόκριση θα πρέπει πάντα να έχουν θετικές τιμές Z-scores και επομένως να δείχνουν υψηλό άθροισμαZ-scorestιμών. Αντίθετα, τα άτομα με χαμηλή απόκριση θα πρέπει πάντα να εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις κάθε μεταβλητής από το συνολικό μέσο όρο, και να έχουν αρνητικό άθροισμα Z-scorestιμών. Τέλος, τα ψάρια με ενδιάμεση ή χωρίς σταθερότητα απόκρισης πρέπει να έχουν ενδιάμεσο άθροισμα Z-scores τιμών. Με τον τρόπο αυτό, οι τιμές των Z-scoresόλων των ατόμων για κάθε μεταβλητή χωριστά κατατάχθηκαν και τα άτομα που ανήκαν στο ανώτερο τεταρτημόριο της κατανομής των Z-scorestιμών ταυτοποιήθηκαν ως άτομα υψηλής απόκρισης (HR) και εκείνα που ανήκαν στο χαμηλότερο τεταρτημόριο ως χαμηλής απόκρισης (LR). Η μέθοδος αυτή διασφαλίζει ότι για τον χαρακτηρισμό αυτών των τύπων αποκρίσεων ελήφθησαν τόσο η ένταση όσο και η συνέπεια της απόκρισης όλων των βιοχημικών παραμέτρων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 6.

Αναλυτικοί προσδιορισμοί

Προσδιορισμός γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης του πλάσματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (GOD/ PAP, BIOSIS, GREECE). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ της γλυκόζης και του ενζύμου γλυκόζοοξειδάση (GOD), η οποία παρουσία του ενζύμου οξειδώνεται και παράγει H2O2. Στη συνέχεια, η αντίδραση του H2O2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.

$$\text{Γλυκόζη} + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{Γλυκονικό οξύ} + 2\ H_2O_2$$

$$2\ H_2O_2 + \text{Αμινοφαιναζόνη} + \text{Φαινολικό παράγωγο} \xrightarrow{POD} \text{Προϊόν ερυθρού χρώματος} + 4\ H_2O$$

Προσδιορισμός χοληστερόλης

Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης του πλάσματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (ENZYMATIKH/ PAP, BIOSIS, GREECE). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση των εστέρων της χοληστερόλης παρουσία του ενζύμου χοληστερόλοεστεράση (CE), ενώ η ολική CH με την βοήθεια του ενζύμου χοληστερόλοοξειδάση (CO) οξειδώνεται και παράγει H_2O_2. Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικόπαράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση

της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο δείγμα.

$$\text{CH-Εστέρες} + H_2O \xrightarrow{CE} \text{CH} + \text{Λιπαρά οξέα}$$

$$\text{CH}_{\text{ολική}} + O_2 \xrightarrow{CO} \text{προϊόν} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{αμινοφαινόλη} \xrightarrow{POD} \text{έγχρωμο προϊόν}$$

$$+ \qquad\qquad +$$

$$\text{Φαινολικό παράγωγο} \qquad\qquad 4H_2O$$

Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Ο προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων του πλάσματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (GPO/PAP, BIOSIS, GREECE). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση των τριγλυκεριδίων παρουσία του ενζύμου λιποπρωτεϊνολιπάση και η παραγόμενη γλυκερόλη με την βοήθεια του ενζύμου γλυκερόλοκινάση (GK) φωσφορυλιώνεται. Η 3-φωσφορική γλυκερόλη παρουσία του ενζύμου γλυκερόλο 3-φωσφορική οξειδάση (GPO)οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή H2O2 η αντίδραση του οποίου με φαινολικό παράγωγο και αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ενζύμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο δείγμα.

$$\text{Τριγλυκερίδια} + H_2O \xrightarrow{\text{λιπάση}} \text{λιπαρά οξέα} + \text{γλυκερόλη}$$

$$\text{Γλυκερόλη} + \text{ATP} \xrightarrow{GK} \text{3-φωσφορική γλυκερόλη} + \text{ADP}$$

$$\text{3-φωσφορική γλυκερόλη} + O_2 \xrightarrow{GPO} \text{προϊόν} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{αμινοφαιναζόνη} \xrightarrow{POD} \text{έγχρωμο προϊόν}$$

$$+ \qquad\qquad +$$

$$\text{Φαινολικό παράγωγο} \qquad\qquad 4H_2O$$

Προσδιορισμός ωσμωτικής πίεση

Ο προσδιορισμός της ωσμωτικής πίεσης έγινε με τη βοήθεια ωσμωμέτρου (OSMOMAT 030D, GONOTECH). Αρχικά, το ωσμώμετρο ρυθμίστηκε με πρότυπο διάλυμα χλωριούχου νατρίου, συγκέντρωσης 300 $mOsmKg^{-1}$και με διάλυμα φυσιολογικού ορού μηδενικής ωσμωτικής πίεσης και στη συνέχεια 50 μl από κάθε δείγμα μετρούνταν σε αυτό.

Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών του πλάσματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (BIURET, BIOSIS, GREECE). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με ιόντα Cu^{++} σχηματίζοντας έγχρωμο προϊόν, σε αλκαλικό περιβάλλον. Η αύξηση της απορρόφησης στα 540nmείναι ανάλογη της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα.

Προσδιορισμός μαγνησίου

Ο προσδιορισμός του μαγνησίου (Mg^{++}) του πλάσματος έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (ΜΕΘΟΔΟΣ XYLIDIL, BIOSIS, GREECE).). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδρασητου μαγνησίου με την ένωση xylidylblueπρος σχηματισμό χηλικής ένωσης ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510-550nmείναι ανάλογη της συγκέντρωσης του μαγνησίου στο δείγμα.

$$\text{Xylidylblue} + Mg^{++} \xrightarrow{OH} \text{>προϊόν ερυθρού χρώματος}$$

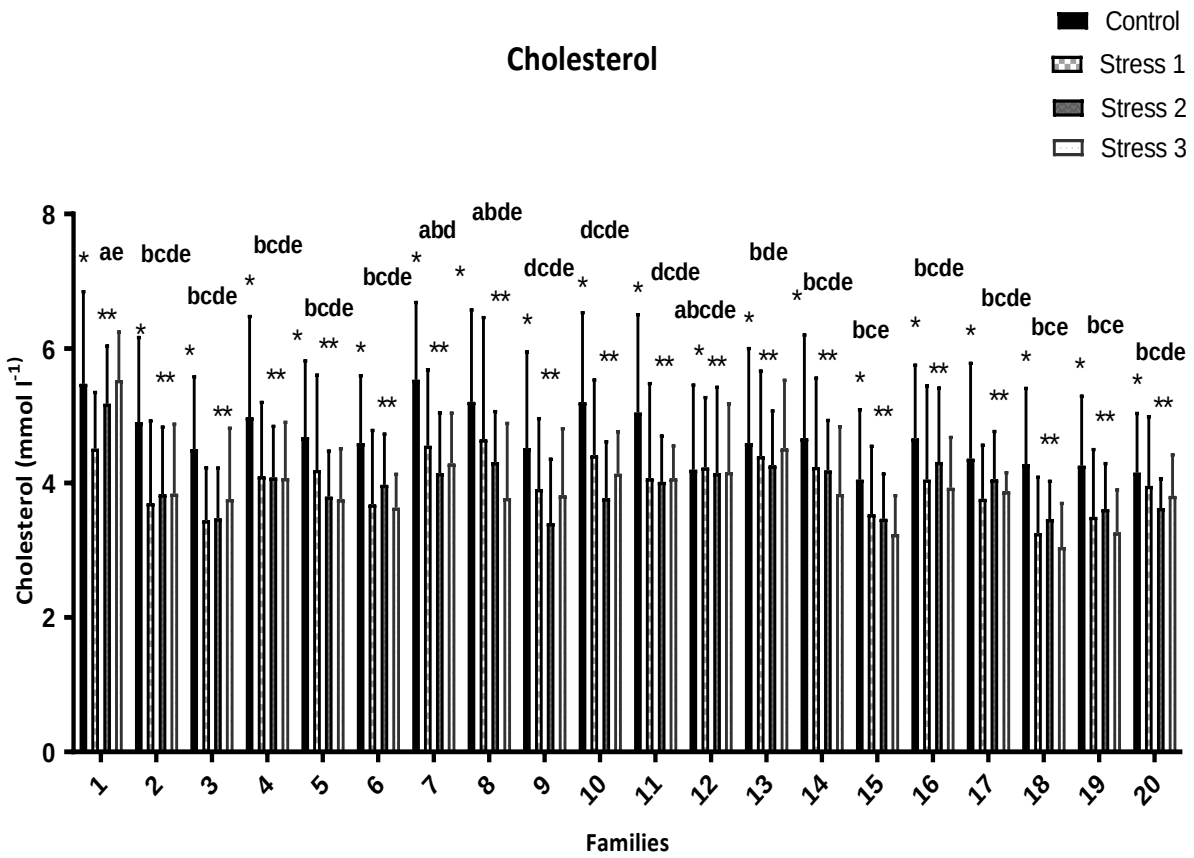
Προσδιορισμός χλωρίου

Ο προσδιορισμό του χλωρίου (Cl^-) έγινε με χρωματομετρική μέθοδο (Thiocyanate-Hg. ColorimetricSPINREACT, SPAIN). Η ποσοτική μετατόπιση του θειοκυανικού άλατος από χλωριούχο θειοκυανικό υδράργυρο και ο επακόλουθος σχηματισμός ενός κόκκινου συμπλόκουθειοκυανικού σιδήρου μετριούνται χρωματομετρικά. Η ένταση του χρώματοςπου σχηματίζεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου στο δείγμα.

Αποτελέσματα

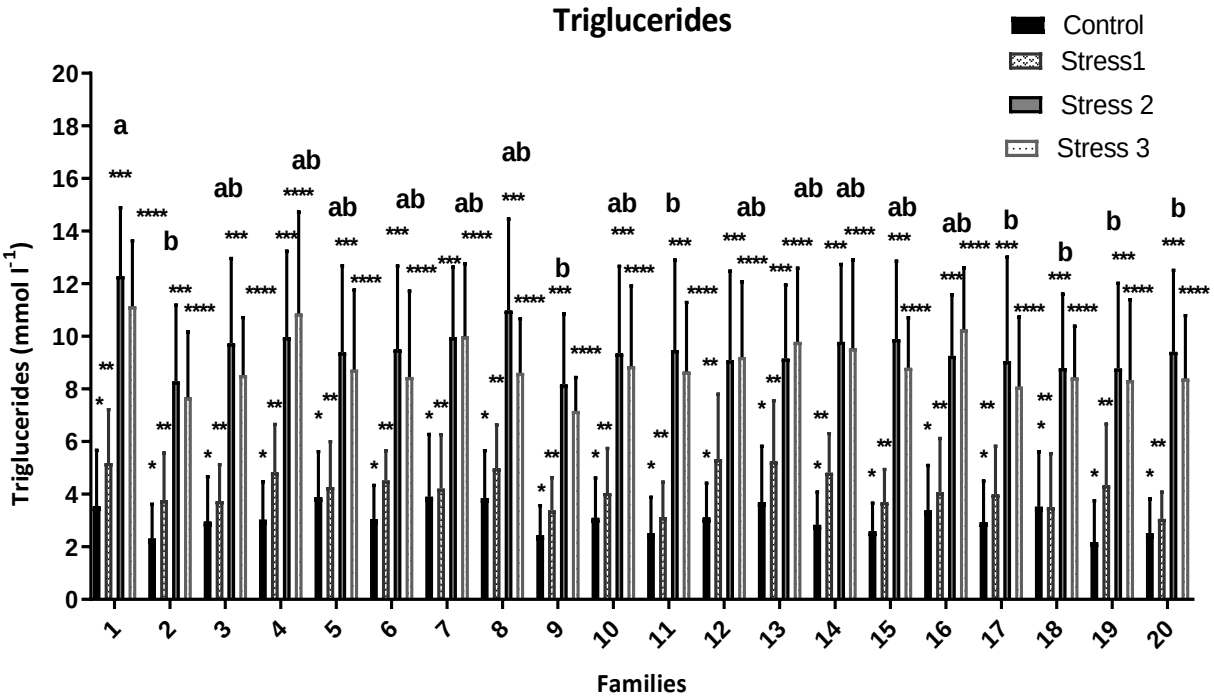
Απόκριση βιοχημικών παραμέτρων σε οξύ στρες και η σχέση των οικογενειών

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο της οικογένειας όσο και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της χοληστερόλης, χωρίς σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο παραγόντων ελέγχου (p-value = 0,06). Συγκεκριμένα, η χοληστερόλη φαίνεται να μειώνεται μετά την εφαρμογή του στρες και να διαφέρει σημαντικά ($F_{3,19}$= 0,001, p-value<0,001) η ομάδα ελέγχου (control) από τις επόμενες δειγματοληψίες. Από την άλλη πλευρά, οι οικογένειες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($F_{19,350}$ = 6,421, p-value<0,001), με την οικογένεια F1 να εμφανίζει ομοιότητες μόνο με τις οικογένειες F8 και F13, ενώ η οικογένεια F18 διαφέρει από την F4, F7,F8, F10, και F11, η F7 με την F3 και F19 και η F15 με την F8 και F13 (**Εικόνα 1**).



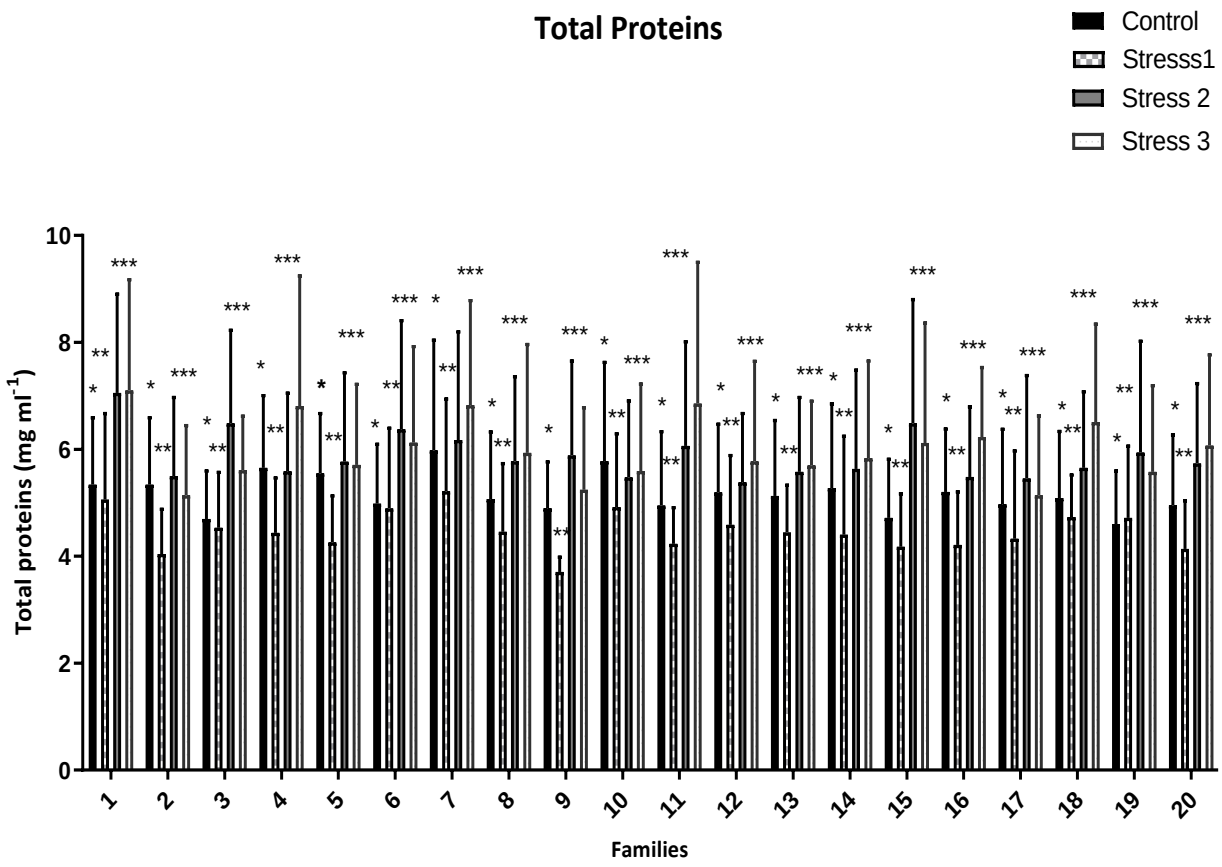
Εικόνα 1. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της χοληστερόλης. Τα γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οικογενειών και οι αστερίσκοι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Στην περίπτωση των τριγλυκερίδιών (**Εικόνα 2**) παρατηρήθηκε, επίσης, στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο της οικογένειας όσο και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος των τριγλυκεριδίων, χωρίς σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο παραγόντων ελέγχου (p-value = 0,094).Συγκεκριμένα, τείνουν να αυξομειώνονται μετά την εφαρμογή των τριών δειγματοληψιών στρες, με την μέγιστη τιμή κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (9,52 ± 0,9 mmol l^{-1}) και τελικά παρατηρείται σημαντική διαφορά($F_{3,57}$ = 897,280, p-value<0,001) μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών (treatments). Επιπλέον, η οικογένεια F1 διαφέρει από τις οικογένειες F2, F6, F9, F11,F17,F19 και F20 ($F_{19,350}$ = 2,994, p-value<0,001).



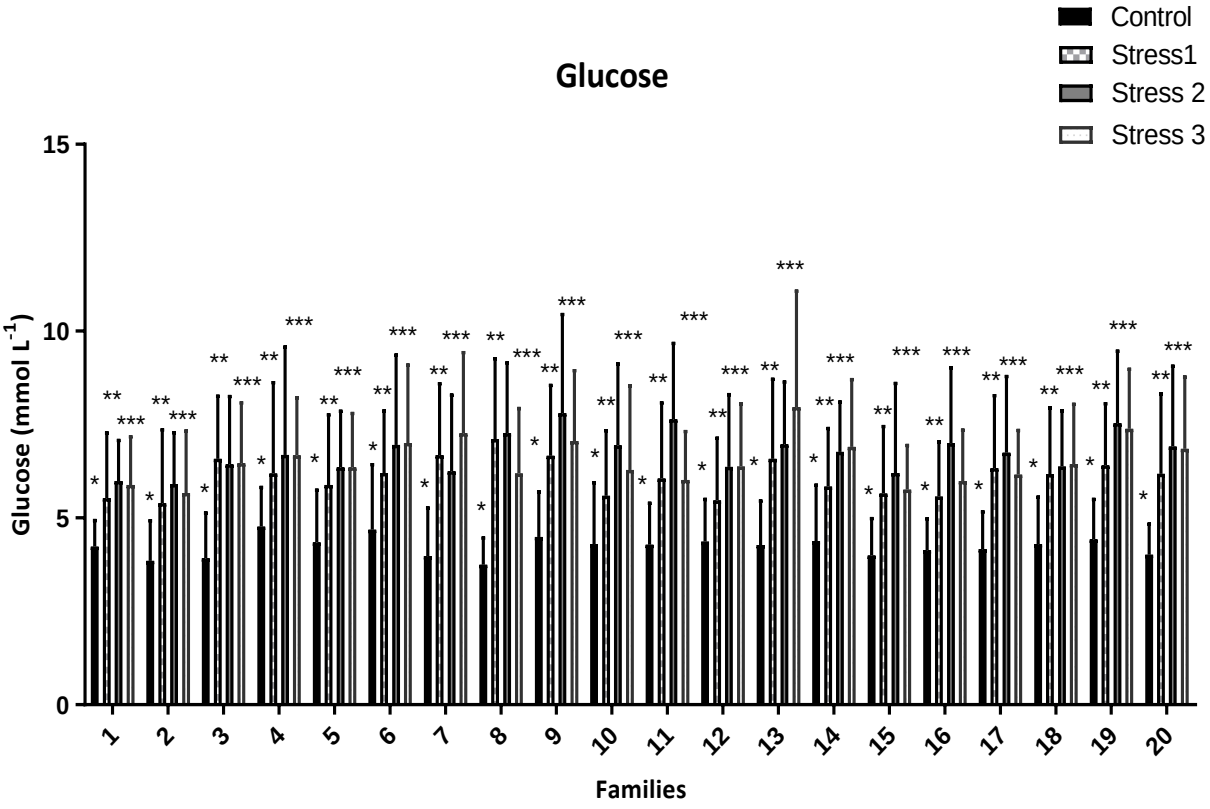
Εικόνα 2. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος των τριγλυκεριδίων. Τα γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οικογενειών και οι αστερίσκοι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Στη μέση συγκέντρωση πλάσματος των ολικών πρωτεϊνών (**Εικόνα3**) παρατηρείται σημαντική μείωση (4,49 ± 0,9 g dl^{-1}) στη πρώτη δειγματοληψία του στρες, ενώ στην συνέχεια παρατηρείτε αύξηση και σταθεροποίηση σε υψηλές τιμές (6 ± 0,6 g dl^{-1}) κατά το **Stress 2** και **Stress 3** ($F_{3,57}$ = 94,788, p-value<0,001). Οι οικογένειες δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($F_{19,350}$ = 1,728, p-value = 0,030) , αλλά ούτε να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων (p-value = 0,051).



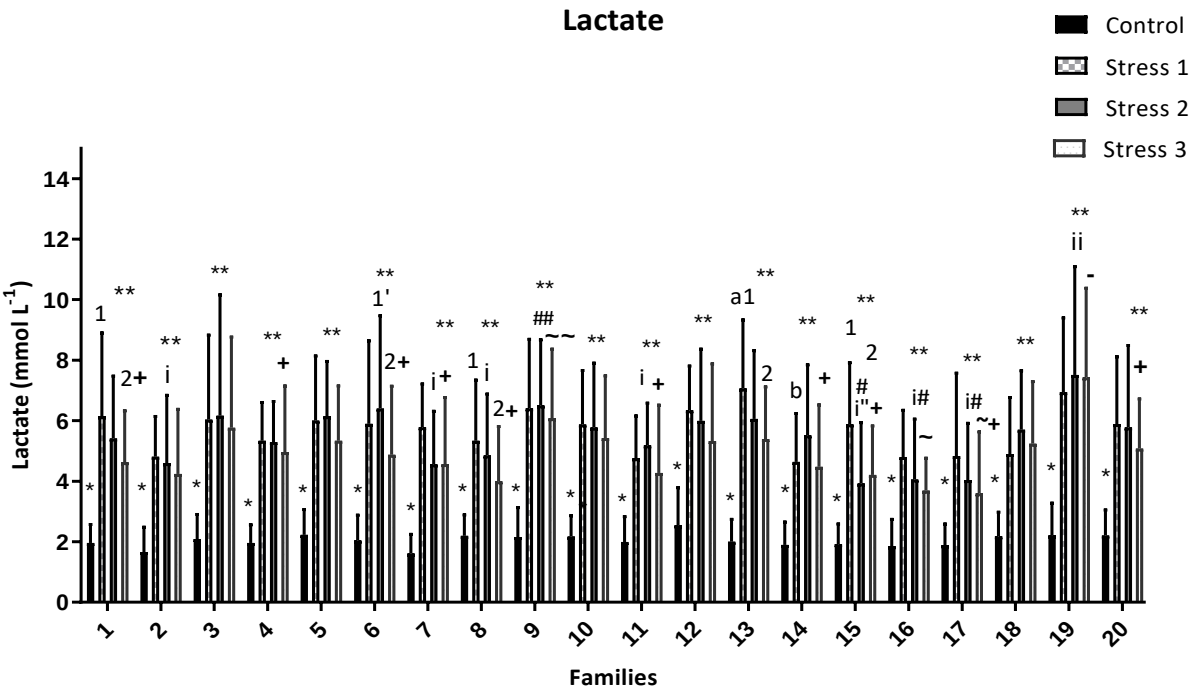
Εικόνα 3. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος των ολικών πρωτεϊνών.Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Η γλυκόζη (**Εικόνα 4**) τείνει να αυξάνεται σημαντικά μετά την εφαρμογή των στρες και να σταθεροποιείται σε υψηλές τιμές στην δεύτερη δειγματοληψία ($F_{3,57}$ = 220,361, p-value<0,001). Ωστόσο, οι οικογένειες δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ($F_{19,350}$ = 1,686, p-value = 0,036) και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων(p-value = 0,118).



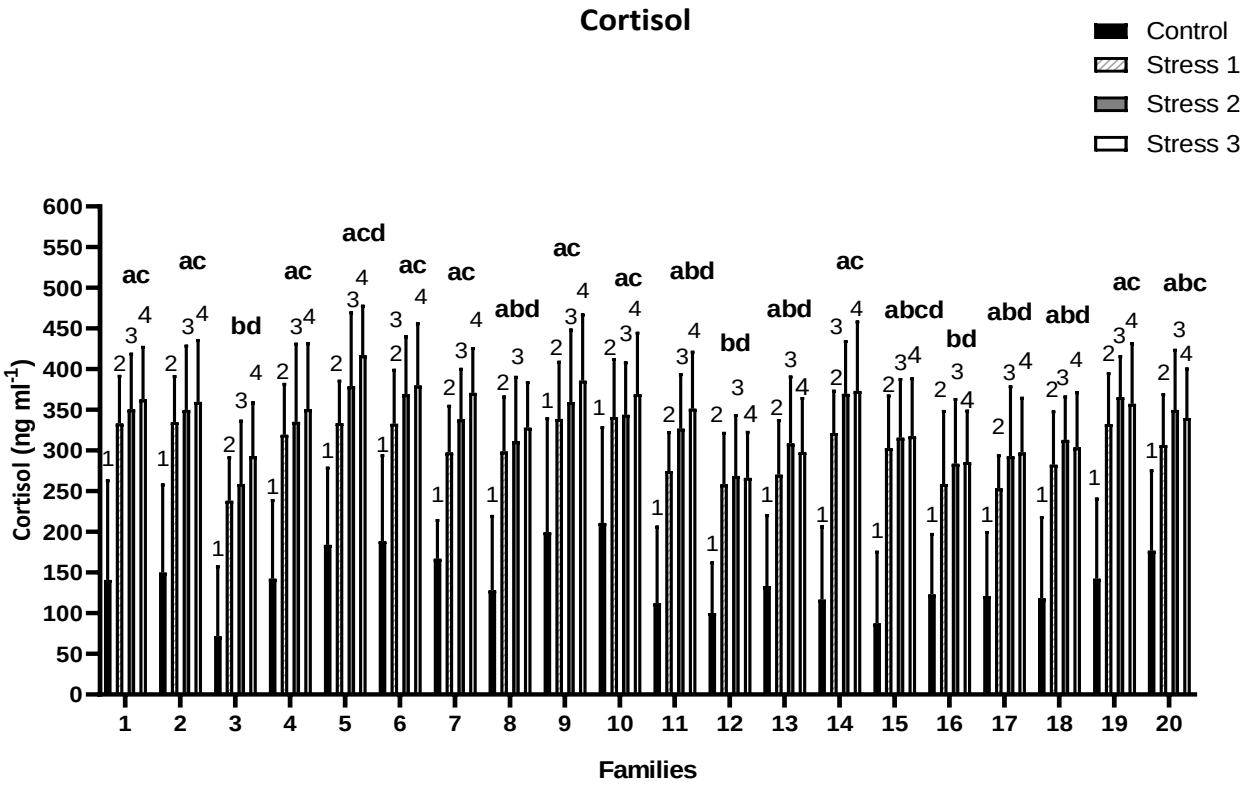
Εικόνα 4. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της γλυκόζης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Στο γαλακτικό οξύ παρατηρείται αυξομείωση μετά την εφαρμογή του στρες και η ομάδα ελέγχου διαφέρει σημαντικά ($F_{3,57}$ = 386,784, p-value< 0,001) από τις τρεις δειγματοληψίες στρες. Παράλληλα, παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων (οικογένειας και χειρισμών, $F_{57,1042}$ = 1,576, p-value = 0,05), γεγονός που δυσκολεύει την εξαγωγή γενικού συμπεράσματος. Συγκεκριμένα, στις οικογένειες F1, F8 και F13 φαίνεται να διαφέρει, επίσης, η πρώτη και η τρίτη δειγματοληψία (**Stress 1** και **Stress 3**) , ενώ στηνF6 διαφέρει η δεύτερη με την τρίτη (**Stress 2** και **Stress 3**). Επίσης, μετά το **Stress1** διαφέρουν οι οικογένειες F13 και F14, μετά το **Stress 2** η οικογένεια F6 με την F15, η F19 με την F2, F7, F8, F11, F15,F16 και F17 και η F9 με την F15, F16, F17. Τέλος, στο **Stress 3** η απόκριση της οικογένειας F19 διαφέρει σημαντικά από την απόκριση 10 οικογενειών (F1, F4, F6, F7, F8, F11, F14, F16, F17 και F20) και η F9 με τις F16 και F17 (**Εικόνα 5**).



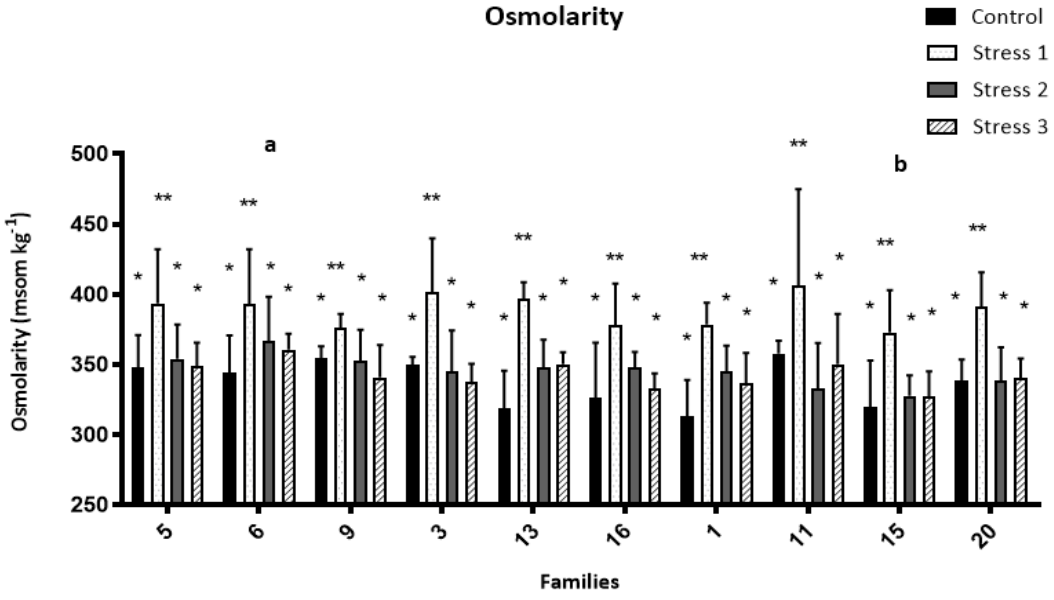
Εικόνα 5. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος του γαλακτικού οξέος. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών, οι αριθμοί και τα υπόλοιπα σύμβολα την αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων (οικογένεια και στρες)(p-value<0,01).

Η μέση συγκέντρωση πλάσματος κορτιζόλης τείνει να αυξάνεται μετά από κάθε χειρισμό (δειγματοληψία,) με αποτέλεσμα να διαφέρουν σημαντικά ($F_{3,57}$ =716,191, p-value< 0,001) όλοι οι χειρισμοί μεταξύ τους. Αν και δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, οι οικογένειες φαίνεται να έχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους ($F_{19,350}$ = 8,410, p-value<0,001) . Αναλυτικότερα, οι αποκρίσεις της οικογένειας F3 διαφέρουν από τις αποκρίσεις 10 οικογενειών (F1, F2, F4, F5, F6, F7, F9, F10, F14, F19), όπως και της F12 (F1, F2, F4, F6, F7, F9, F10, F14, F19, F20) και η οικογένεια F5 από τις αποκρίσεις 7 οικογενειών (F8, F11, F12, F13, F16, F17, F18).Ακολουθούν άλλες 5 οικογένειες (F13, F15, F16, F17, F18) οι οποίες αποκλίνουν από άλλες 3 έως 6 οικογένειες, όπως φαίνεται κ στο παρακάτω διάγραμμα.



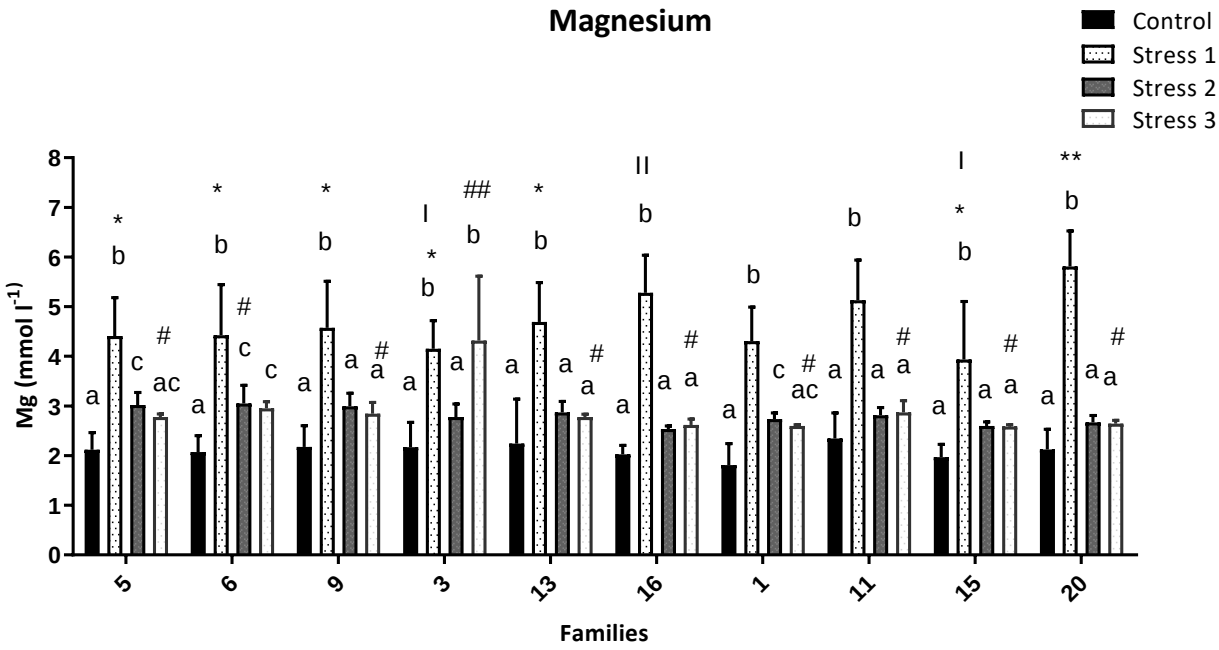
Εικόνα 6. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της κορτιζόλης. Τα γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οικογενειών και οι αστερίσκοι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Η μέση ωσμωτική συγκέντρωση πλάσματος (**Εικόνα 7**) παρουσιάζει αύξηση μετά την πρώτη δειγματοληψία στρες και φαίνεται να διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($F_{3,27}$ = 46,326, p-value< 0,001)τόσο με την ομάδα ελέγχου (control), όσο και με τις επόμενες δειγματοληψίες, στις οποίες οι τιμές της ωσμωτικής έχουν επιστρέψει στις αρχικές τιμές αναφοράς. Σημαντική, επίσης, διαφορά παρατηρείται μεταξύ της οικογένειάς F6 και F15 ($F_{9,3}$= 2,522, P<0,010) χωρίς όμως την ύπαρξη αλληλεπίδρασης (p-value = 0,762) μεταξύ των παραγόντων της οικογένειας και των χειρισμών (treatments).



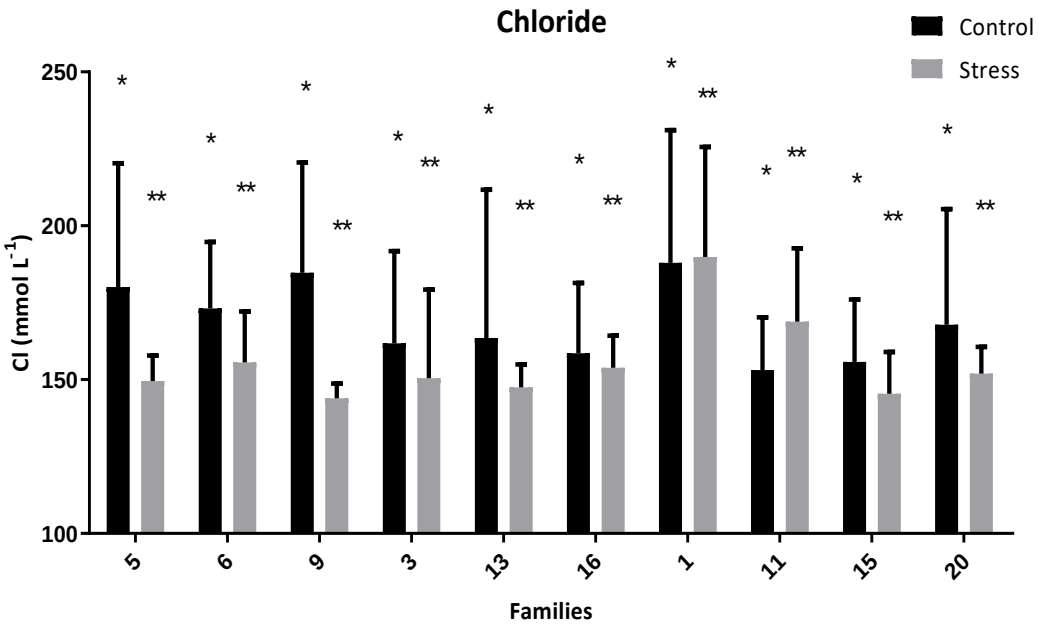
Εικόνα 7. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της ωσμωτικής. Τα γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οικογενειών και οι αστερίσκοι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Το μαγνήσιο φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο της ωσμωτικής πίεσης, να αυξάνεται δηλαδή μετά το πρώτο στρες και να επιστρέφει στις αρχικές τιμές του στους δύο επόμενους χειρισμούς (treatments), σημειώνοντας έτσι σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου (control) και δυο τελευταίων στρες με την πρώτη δειγματοληψία στρες($F_{3,27}$ = 201,396, p-value< 0,001). Στην περίπτωση όμως των μέσων συγκεντρώσεων μαγνησίου πλάσματος, παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων της οικογένειας και των χειρισμών $F_{27,116}$ = 2,792, p-value<0,001). Συγκεκριμένα, στην **Stress 1** η οικογένεια F20 διαφέρει με όλες τις οικογένειες εκτός από την F11 και F16,η F15 διαφέρει με την F11 και την F16, ενώ η F3 με την F16, ενώ στην **Stress 3** η οικογένεια F3 φαίνεται να διαφέρει με όλες τις υπόλοιπες οικογένειες (**Εικόνα 8**).



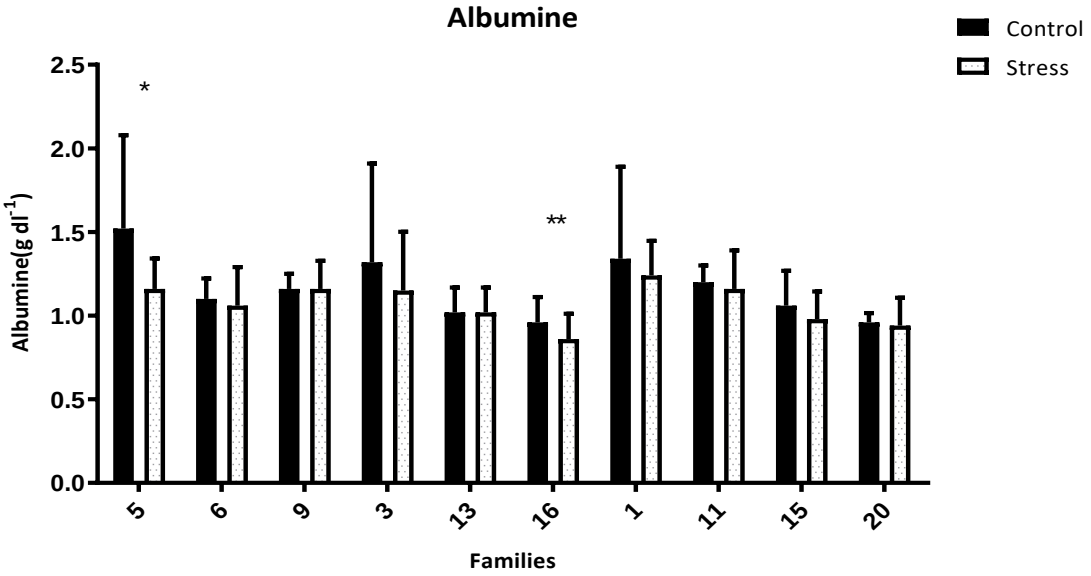
Εικόνα 8. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος του μαγνησίου. Τα γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών και τα υπόλοιπα σύμβολα την αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων (οικογένεια και στρες)(p-value<0,01).

Το χλώριο (**Εικόνα 9**), στο οποίο έχει γίνει η ανάλυση μόνο της πρώτης εφαρμογής στρες, φαίνεται να ακολουθείται ένα αντίθετο μοτίβο από το μαγνήσιο και την ωσμωτική συγκέντρωση, με σημαντική μείωση μετά την εφαρμογή του πρώτου στρες ($F_{9,1}$ = 5,754, p-value< 0,001). Ωστόσο, οι οικογένειες δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ τους (P = 0,159), αλλά ούτε να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων (P = 0,569).



Εικόνα 9. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος του χλωρίου. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (p-value<0,01).

Η αλβουμίνη (**Εικόνα 10**), στην οποία έγινε η ανάλυση μόνο της πρώτης δειγματοληψίας στρες, δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές ($F_{1,9}$ = 2,788, p-value = 0,09), ούτε υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων (p-value = 0,919). Παρόλα αυτά, οι οικογένειες F5 και F16 φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($F_{9,1}$ = 2,887, p-value = 0,05).



Εικόνα 10. Η επίδραση της οικογένειας και του χειρισμού (στρες) στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος της αλβουμίνης. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οικογενειών (p-value<0,05).

Τέλος, όσον αφορά το βάρος, παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές και στους 4 χειρισμούς ($F_{3,57}$ = 3522,891, p-value< 0,001), καθώς επίσης παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων της οικογένειας και του χειρισμού ($F_{57,1044}$ = 6,922, p-value< 0,001).

Συσχέτιση παραμέτρων

Η ανάλυση μεταξύ των παραγόντων δεικτών, όπως παρουσιάζεται στους παρακάτω **Πίνακες 1-4** , έδειξε ισχυρή θετική σχέση συσχέτιση μεταξύ της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, καθώς και των τριγλυκεριδίων με τις ολικές πρωτεΐνες (p-value< 0,001), τόσο στην ομάδα ελέγχου, όσο και μετά την εφαρμογή των του στρες (και στις τρεις δειγματοληψίες). Επίσης, το γαλακτικό οξύ με και οι ολικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση σε όλες τις δειγματοληψίες, εκτός από την **Stress 3**. Ομοίως, η ωσμωτικότητα με το μαγνήσιο και το γαλακτικό οξύ ακολουθούν το ίδιο πρότυπο ισχυρής θετικής συσχέτισης, στις 3 από τις 4 δειγματοληψίες.

Ωστόσο, η κορτιζόλη παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με 4 από τις 9 παραμέτρους (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, ωσμωτικότητα, ολικές πρωτεΐνες) στην ομάδα ελέγχου και μετά την εφαρμογή του **Stress 2**. Τέλος, το βάρος δεν φαίνεται να έχει συσχέτιση με καμία από τις παραμέτρους.

Πίνακας 1. Συσχέτιση βιοχημικών και ορμονικών δεικτώνστην ομάδα ελέγχου (control) (αναγράφονται μόνο οι σημαντικές συσχετίσεις)

Μεταβλητή	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ	Κορτιζόλη	Ολικές πρωτεινες	Ωσμωτικότητα	Mg	Βάρος
Χοληστερόλη		0,166			-0,118	0,147			
Τριγλυκερίδια						0,192**			
Γλυκόζη									
Γαλακτικό οξύ		0,11				0,118			
Κορτιζόλη			0,139						
Ολικές πρωτεινες									
Ωσμωτικότητα	0,412			0,347	-0,407				
Mg		0,381					0,614**		
Βάρος									

Συσχέτιση μεταβλητώνστην ομάδα ελέγχου (control) (αναγράφονται μόνο οι σημαντικές συσχετίσεις)

p-value < 0,05
** p-value < 0,01

Πίνακας 2. Συσχέτιση βιοχημικών και ορμονικών δεικτών στη **Stress 1** δειγματοληψία (αναγράφονται μόνο οι σημαντικές συσχετίσεις)

Μεταβλητή	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ	Κορτιζόλη	Ολικές πρωτεινες	Ωσμωτικότητα	Mg	Βάρος
Χοληστερόλη		0,220**							
Τριγλυκερίδια						0,248			
Γλυκόζη									
Γαλακτικό οξύ						0,149			
Κορτιζόλη									
Ολικές πρωτεινες									
Ωσμωτικότητα								0,304	
Mg									
Βάρος									

p-value < 0,05
** p-value < 0,01

Πίνακας 3.Συσχέτιση βιοχημικών και ορμονικών δεικτών στη **Stress 2** δειγματοληψία (αναγράφονται μόνο οι σημαντικές συσχετίσεις)

Μεταβλητή	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ	Κορτιζόλη	Ολικές πρωτεινες	Ωσμωτικότητα	Mg	Βάρος
Χοληστερόλη		0,109							
Τριγλυκερίδια					-0,136	0,513**			
Γλυκόζη									
Γαλακτικό οξύ		0,110				0,218**			
Κορτιζόλη									
Ολικές πρωτεινες			-0,158		-0,144				
Ωσμωτικότητα			0,359	0,471**					
Mg				0,238			0,614**		
Βάρος									

p-value < 0,05
** p-value < 0,01

Πίνακας 4. Συσχέτιση βιοχημικών και ορμονικών δεικτών στη **Stress 3** δειγματοληψία (αναγράφονται μόνο οι σημαντικές συσχετίσεις)

Μεταβλητή	Χοληστερόλη	Τριγλυκερίδια	Γλυκόζη	Γαλακτικό οξύ	Κορτιζόλη	Ολικές πρωτεινες	Ωσμωτικότητα	Mg	Βάρος
Χοληστερόλη		0,263**							
Τριγλυκερίδια						0,278**			
Γλυκόζη									
Γαλακτικό οξύ									
Κορτιζόλη									
Ολικές πρωτεινες									
Ωσμωτικότητα				0,374					
Mg									
Βάρος									

p-value< 0,05
** p-value< 0,01

Επαναληπτικότητα και ταυτοποίηση LR και HR ατόμων

Η ανάλυση των συγκεντρώσεων των βιοχημικών παραμέτρων μετά την εφαρμογή των χειρισμών στρες έδειξε ότι οι περισσότερες από τις μεταβλητές αποτελούν ένα ατομικό σταθερό χαρακτηριστικό. Συγκεκριμένα, όλοι οι παράμετροι που αναλύθηκαν, σε όλες οι δειγματοληψίες, εκτός από το Mg($F_{9,39}$ = 1,587, p-value = 0,130) παρουσίασαν επαναληπτικότητα, όπως πρόκυψε μετά την επεξεργασία δεδομένων με nested ANOVA (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5. Η επαναληπτικότητα για κάθε βιοχημικό δείκτη ξεχωριστά.

Μεταβλητή	r	F	p-value
Χοληστερόλη	0,69	$F_{19,348}$ = 13,395	< 2e-16 ***
Τριγλυκερίδια	0,25	$F_{19,350}$ = 3,523	7.60e-07
Ολικές πρωτεϊνες	-0,02	$F_{19,346}$ = 1,716	0.0298
Κορτιζόλη	0,68	$F_{19,350}$ = 25,203	<2e-16 ***
Γαλακτικό οξύ	0,51	$F_{19,350}$ = 10,751	0.000202 ***
Ωσμωτικότητα	0,09	$F_{9,40}$ = 2,943	0.003880

Βάσει αυτής της επαναληπτικότητας ήταν εφικτό να επιλεγούν άτομα υψηλής (HR), χαμηλής (LR) και ενδιάμεσης (IR) απόκρισης στο στρες, με τη χρήση των Z-scores. Οι ομάδες αυτές των ψαριών έδειξαν στατιστικά διαφορετικές συγκεντρώσεις πλάσματος χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, κορτιζόλης, γαλακτικού οξέος, ωσμωτικότητας και ολικών

πρωτεϊνών σε όλες τις δειγματοληψίες, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα LR από τα HR άτομα (p-value< 0,001).

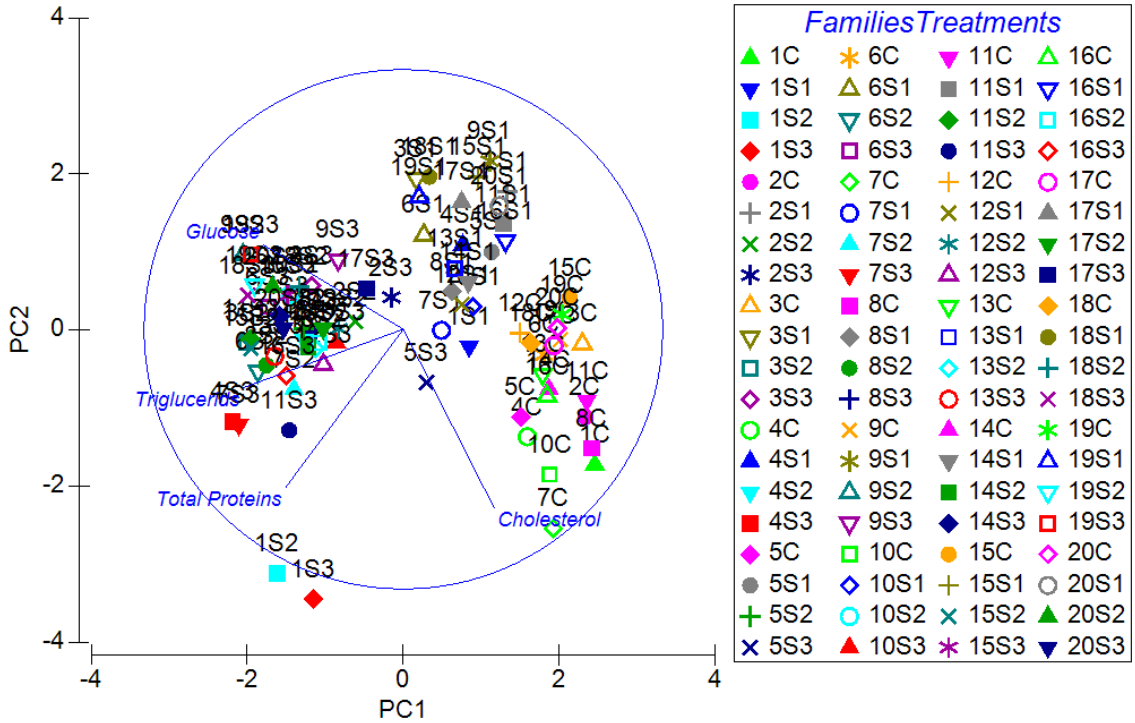
Ο **Πίνακας 6** δίνει τους μέσους όρους των δεικτών μετά την κατανομή των ψαριών σε άτομα χαμηλής και υψηλής απόκρισης. Συγκεκριμένα, παρατίθενται τα άτομα που παρουσίασαν σταθερά χαμηλή ή υψηλή απόκριση και η ομάδα ελέγχου (control), ενώ παραλείπονται τα άτομα ενδιάμεσης απόκρισης. Η σύγκριση των ομάδων, μέσα σε κάθε δείκτη, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (p-value< 0,01), εκτός από την ωσμωτικότητα κατά την οποία η ομάδα ελέγχου και τα LR άτομα δεν παρουσίασαν διαφορές (p-value = 0,108). Αν και ο παράγοντας της οικογένειας επηρέασε κάποιές από τις βιοχημικές παραμέτρους, όπως αναλύθηκε στην παραπάνω υπο-ενότητα, δεν έπαιξε κάποιο σημαντικό ρολό στην διάκριση των ατόμων υψηλής και χαμηλής απόκρισης.

Πίνακας 6.Οι τιμές (mean±SD) των συγκεντρώσεων των βιοχημικών δεικτών, μετά την κατανομή των ψαριών σε άτομα χαμηλής (LR) και υψηλής (HR) απόκρισης για κάθε δείκτη ξεχωριστά (αναγράφονται οι τιμές control με τις οποίες γίνεται σύγκριση). Τα γράμματα υποδεικνύουν διαφορές μεταξύ των ατόμων HR, LRκαι της ομάδας ελέγχου (control) (p-value< 0,01).

Μεταβλητή	LR	HR	Control
Χοληστερόλη (mmol l^{-1})	3,02 ±0,5^{a}	5 ± 0,7^{b}	4,7 ± 0,4^{c}
Τριγλυκερίδια (mmol l^{-1})	5,14 ± 2,5^{a}	10,16±3,9^{b}	3,07 ± 0,5^{c}
Ολικές πρωτεϊνες(mgml^{-1})	4,1 ± 0,8^{a}	7,1 ± 2^{b}	5,2 ± 0,3^{c}
Κορτιζόλη (ng mL^{-1})	255,6±43,7^{a}	408,7±48,7^{b}	140,2±100^{c}
Γαλακτικό οξύ (mmol l^{-1})	3,6 ± 1,3^{a}	7,5 ± 1,8^{b}	4,2 ± 1,2^{c}
Ωσμωτικότητα (msom kg^{-1})	339 ± 24^{a}	379 ± 32^{b}	338,7±18,6^{a}

Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Μετά την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), κατά την οποία μελετήθηκαν όλες οι βιοχημικές παράμετροι, προέκυψε ότι οι κύριες μεταβλητές που εξηγούν το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας είναι η γλυκόζη, τα τριγλυκερίδια, η χοληστερόλη και οι ολικές πρωτεΐνες, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή των 4 μεταβλητών, οι 2 από τις κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2) συνεισφέρουν 86,7% στην ολική μεταβλητότητα, έναντι των μικρότερων ποσοστών (<80%) με την προσθήκη περισσότερων παραμέτρων.



Εικόνα 12. Γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA).

Επιπλέον, η δημιουργία 3 υποσυνόλων είναι ευδιάκριτη , οι οποίες αποτελούνται από την ομάδα ελέγχου, από την ομάδα της **Stress 1** και την ομάδα της **Stress 2** & **3**, χωρίς να φαίνεται να παίζει ρόλο ο παράγοντας της οικογένειας. Παρόλα αυτά, η οικογένεια F1 για την **Stress 2&3**, παρουσιάζει απόκλιση από τις υπόλοιπες οικογένειες, γεγονός που επιβεβαιώνεται και με τις εργαστηριακές αναλύσεις, καθώς η οικογένεια αυτή διαφέρει με τις περισσότερες.

Ανάπτυξη μεταβολικού δείκτη

Το επόμενο και τελευταίο βήμα της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εξέταση δυο ακόμη μεταβολικών δεικτών,HDLκαι LDL,η οποία δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη και βρίσκεται σε εξέλιξη.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία έχει ως κύριο σκοπό την ανάπτυξη μεταβολικού προφίλ στο λαβράκι σε συνάρτηση με το γενετικό υπόβαθρο και το στρες καθώς και την ανάπτυξη ορίων αναφοράς διάφορων βιολογικών δεικτών (γλυκόζη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ωσμωτική πίεση, χλώριο, μαγνήσιο). Περαιτέρω, να εξεταστεί η σταθερότητα απόκρισης στο στρες και να τακτοποιηθούν οικογένειες με υψηλό και χαμηλό μεταβολικό δείκτη.

Μετά την περιοδική εφαρμογή του πρωτόκολλου του στρες σε διάστημα 20 ημερών, στην πειραματική ομάδα αναμένεται να παρατηρηθεί είτε εγκλιματισμός, είτε σταθερή, ή ταχύτερη απόκριση στην καταπόνηση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη εργασία έδειξαν ότι οι 4 από τους 10 μεταβολικούς δείκτες, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, κορτιζόλη και ολικές πρωτεΐνες, έδειξαν ταχύτερη απόκριση μετά τη **Stress 2,** με την κορτιζόλη να τείνει να αυξάνεται ακόμη περισσότερο και μετά την **Stress 3**, ενώ οι άλλες παράμετροι σταθεροποιούνται, σε υψηλά όμως επίπεδα. Το γεγονός αυτό πιθανόν να αποδεικνύει, αφενός, ότι ο χρόνος ανάκαμψης δεν ήταν επαρκής μεταξύ των χειρισμών. Αφετέρου δε το λαβράκι, ως ένα είδος ιδιαίτερα ευαίσθητο στην καταπόνηση, με υψηλές τιμές κορτιζόλης, επηρέασε και την δευτερογενή απόκριση των υπόλοιπων μεταβολιτών (Fanouraki etal., 2011).

Από την άλλη πλευρά, η χοληστερόλη και το γαλακτικό οξύ έδειξαν σταθερή απόκριση μετά την εφαρμογή των τριών δειγματοληψιών στρες, ενώ η οσμωτικότητα και το Mg φάνηκε να εγκλιματίζονται μετά τη **Stress 2.** Στην περίπτωση του χλωρίου, δεν υπάρχει σαφή εικόνα, παρά μόνο αύξηση της συγκέντρωσής του μετά την **Stress 1**, καθώς έγινε ανάλυση μόνο για τη συγκεκριμένη δειγματοληψία.

Σύμφωνα με παλιότερη μελέτη, το *S. aurata,* μετά από περιοδική έκθεση σε οξεία καταπόνηση, παρουσίασε σταθερή απόκριση σχεδόν σε όλους τους μεταβολικούς του δείκτες (κορτιζόλη, γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, ωσμωτικότητα), με εξαίρεση την κορτιζόλη, η οποία αυξήθηκε σημαντικά μετά την τρίτη δειγματοληψία στρες, επιστρέφοντας στις αρχικές τιμές αμέσως μετά (Tort et al., 2001).

Όσον αφορά τον δεύτερο υπό μελέτη παράγοντα (η οικογένεια), οι σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ τους ως προς την απόκριση της χοληστερόλης, των τριγλυκερίδιων και της κορτιζόλης μπορεί να αποτελεί ένδειξη της επίδρασης του γενετικού υπόβαθρου. Παρόλα αυτά, οι υπόλοιποι παράμετροι (ολικές πρωτεΐνες, γλυκόζη, ωσμωτικότητα) δείχνουν ανεπηρέαστοι από τον παράγοντα αυτό αλλά η απόκριση τους εξαρτάται αποκλειστικά από το στρες.

Η επαναληπτικότητα που παρατηρήθηκε στις περισσότερες μεταβλητές, πλην του Mg, αποδεικνύει ότι αποτελούν ένα σταθερό ατομικό χαρακτηριστικό, συμβάλλοντας στην περαιτέρω διάκριση των ατόμων με συνεχή υψηλή (HR) ή χαμηλή (LR) απόκριση, μετά την έκθεση σε οξύ στρες.

Σε ένα γενικό πλαίσιο, οι επιπτώσεις που θα επιφέρει ένας στρεσσογόνος παράγοντας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο που τον αντιλαμβάνεται και τον αντιμετωπίζει

ένας οργανισμός. Από μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, προκύπτει το γεγονός ότι άτομα του ίδιου είδους μπορεί να έχουν σταθερά αποκλίνουσες φυσιολογικές και συμπεριφορικές αποκρίσεις σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα ή στρεσσογόνο παράγοντα. Στις περισσότερες από τις εργασίες αυτές, εξετάστηκε κυρίως η απόκριση της κορτιζόλης και έγινε ο διαχωρισμός των HR και LR ατόμων σε διάφορα είδη, όπως την τσιπούρα (Tort et al., 2001), τον μπακαλιάρο του Ατλαντικού, *Gadus morhua*, (Hori et al., 2012),την ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*, (Sopinka et al., 2016), το λαβράκι (Samaras et al., 2016). Η διαφορά αυτή, στην απόκριση της κορτιζόλης, θα μπορούσε να σχετίζεται με μεταβολές στον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Μεσονεφρικός ιστός (HPI), στην βιοσυνθετική ικανότητα του μεσονεφρικού ιστού ή / και σε πτυχές απομάκρυνσης της κορτιζόλης (Hori et al., 2012). Κατ' επέκταση, μπορεί να συσχετίζεται με συμπεριφορικές διαφορές, αλλά και την απόδοση και την φυσική κατάσταση των οργανισμών. Συγκεκριμένα, οι δυο ομάδες ατόμων παρουσιάζουν διαφορές στην αύξηση, σε μεταβολικούς δείκτες του πλάσματος, σε αποθέματα υδατανθράκων στο ήπαρ , στην ενζυμική δραστηριότητα και στη διαφορική έκφραση πολλών γονίδιων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων μεταβολικών και ανοσολογικών λειτουργιών (Samaras et al., 2016). Δίνοντας έτσι μια πολύπλευρη εξήγηση στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Ο προσδιορισμός τέτοιων ενδο-ειδικών διαφορών, τόσο στην απόκριση της κορτίζολης, όσο και των υπόλοιπων μεταβολικών παραμέτρων, καθώς και η κατανόηση των επιπτώσεων τους στην απόδοση και τη φυσική κατάσταση των εκτρεφόμενων ψαριών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ιδανικότερων συνθηκών διαβίωσής και στην επιλογή αποθεμάτων αναπαραγωγής (breeding stock) σε προγράμματα γενετικής επιλογής (Samaras et al., 2016). Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι στα ψάρια η απόκριση στο στρες, η οποία σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με τις συγκεντρώσεις διάφορων μεταβολιτών, έχει γενετική συνιστώσα, αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα στην επιλεκτική αναπαραγωγή (Millot et al.,2010).

Οι διάφοροι στρεσσογόνοι παράγοντες που εκτίθενται τα ψάρια, κυρίως σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, προκαλούν μια «τυπική» απόκριση στο στρες, προσαρμοστικής αξίας, η οποία περιλαμβάνει την άμεση απελευθέρωση κατεχολαμινών και κορτιζόλης (πρωτογενής απόκριση) επηρεάζοντας, δευτερογενώς, ένα πλήθος φυσιολογικών διεργασιών : σίτιση, ωσμωρύθμιση, ενδιάμεσο μεταβολισμό, υδρομεταλλική ισορροπία, καρδιακό και αναπνευστικό ρυθμό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορεί να εξηγηθεί η συσχέτιση της κορτιζόλης με τους υπόλοιπους μεταβολικούς παράγοντες, όπως προκύπτουν από τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η απελευθέρωση της κορτιζόλης προκαλεί εξώθηση των μονοσθενών ιόντων, διαταράσσοντας έτσι την εσωτερική συγκέντρωση των ιόντων και κατ' επέκταση την ωσμωτικότητα (Tort et al., 2001). Επιπλέον, αποτελεί πρόδρομο μόριο της χοληστερόλης και προάγει τη λιπογένεση, συσχετιζόμενη έτσι με τα λιπίδια (Le Blanc et al., 2005). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη εργασία, δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση μεταξύ της κορτιζόλης και της γλυκόζης, κάτι που έχει βρεθεί και στην περίπτωση του *S. aurata* (Tortet al., 2001).

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA), μετά την επεξεργασία όλων των υπό μελέτη βιοχημικών παραμέτρων, συνέβαλε τόσο στην επιλογή των κύριων μεταβλητών, όσο και στην συνολική τους απεικόνιση. Συγκεκριμένα, η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, οι ολικές πρωτεΐνες και η γλυκόζη εξηγούν το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας. Από την άλλη πλευρά, το γενετικό υπόβαθρο (οικογένειες) δεν φαίνεται να έπαιξε ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, με εξαίρεση σε μια οικογένεια (F1). Επιπλέον, 3 διακριτά υποσύνολα φαίνεται από την γραφική παράσταση να έχουν δημιουργηθεί, συμβαδίζοντας με τις εργαστηριακές αναλύσεις, καθώς οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίζονται μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της πρώτης δειγματοληψίας και των δυο τελευταίων δειγματοληψιών στρες.

Για την ολοκλήρωση της εργασίας, απαιτούνται και άλλες αναλύσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τις μετρήσεις LDL και HDL.

Βιβλιογραφία

Bagni M., 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchuslabrax*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en

Coeurdacier J., Dutto G., Gasset E. andBlancheton J., 2011.Is total serum protein a good indicator for welfare in reared sea bass (*Dicentrarchuslabrax*)?Aquat. Living Resour.Volume 24, Number **2**, April-June 2011. https://doi.org/10.1051/alr/2011130

Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., 2005. Blood Chemistry and Histological Properties of Wild and Cultured Sea Bass (*Dicentrarchuslabrax*) in the North Adriatic Sea. *Vet Res Commun* **29,** 677–687 (2005). https://doi.org/10.1007/s11259-005-3684-z

FanourakiE., PapandroulakisN., EllisT.,Mylonas C., Scott A.&PavlidisM., 2008. Water cortisol is a reliable indicator of stress in European sea bass, *Dicentrarchuslabrax*. Behaviour. 145. 1267-1281. 10.1163/156853908785765818.

Fanouraki, E., Mylonas, C. C., Papandroulakis, N. &Pavlidis, M.,2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. Gen. Comp. Endocrinol. 173, 313–322 (2011)

FatiraE., PapandroulakisN., Pavlidis M., 2013. Diel changes in plasma cortisol and effects of size and stress duration on the cortisol response in European sea bass (*Dicentrarchuslabrax*). Fish physiology and biochemistry. 40. 10.1007/s10695-013-9896-1.

Hori T., Gamperl T., Hastings C., Voort G.,Robinson J., Johnson S., Afonso L., 2012. Inter-individual and -family differences in the cortisol responsiveness of Atlantic cod (*Gadus morhua*) ,Aquaculture,Volumes 324–325,2012,Pages 165-173,SSN 0044-8486,https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.040.

Islam M., Slaterb M. T., Bögnerb M., Zeytinb S., Kunzmann ., 2020. Extreme ambient temperature effects in European seabass, *Dicentrarchus labrax*: Growth performance and hemato-biochemical parameters. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735093

Korte S. M., Olivier B.,KoolhaasJ. M., 2007.A new animal welfare concept based on allostasis,Physiology & Behavior,Volume 92, Issue 3,2007,Pages 422-428,ISSN 0031-9384,https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.10.018.

LeBlanc, J., & Ducharme, M. B., 2005. *Influence of personality traits on plasma levels of cortisol and cholesterol. Physiology & Behavior, 84(5), 677–680.*doi:10.1016/j.physbeh.2005.02.020

Lawrencea M.,Jain-Schlaepfera S., Zolderdoa A.,Algeraa D.,Gilmourc K., Gallagher A., and Cookea S., 2017.Are 3-minutes good enough for obtaining baseline physiological samples from teleost fish?Canadian Journal of Zoology, 96 (7). pp. 774-786.https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0093

MaricchioloG., CarusoG. & GenoveseL., 2008. Haematological and Immunological Responses in Juvenile Sea Bass (*Dicentrarchuslabrax L.)* After Short-Term Acute Stress. The Open Fish Science Journal. 1. 28-35. 10.2174/1874401X00801010028.

MillotS., PéanS., LeguayD., VergnetA., ChatainB., BégoutM.-L., 2010.Evaluation of behavioral changes induced by a first step of domestication or selection for growth in the European sea bass (Dicentrarchuslabrax): A self-feeding approach under repeated acute stress. Aquaculture 306 (2010) 211–217. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.04.027

Pavlidis M, Karantzali E., Fanouraki E.,Barsakis C.,Kollias S.,Papandroulakis N.,2010. Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarhuslabrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development,Aquaculture, Volume 315, Issues 1–2,2011, Pages 125-130,SSN 0044-8486,https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.013.

Peres H, Santos S, Oliva-Teles A., 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (Dicentrarchuslabrax). Fish PhysiolBiochem. 2014 Oct;40(5):1339-47. doi: 10.1007/s10695-014-9928-5. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24647468.

Samaras, A., Dimitroglou, A., Sarropoulou, E., 2016. Repeatability of cortisol stress response in the European sea bass (*Dicentrarchuslabrax*) and transcription differences between individuals with divergent responses. *Sci Rep* **6,** 34858 (2016). https://doi.org/10.1038/srep34858

Samaras A., Papandroulakis N., Costari M., Pavlidis M., 2015. Stress and metabolic indicators in a relatively high(European sea bass, *Dicentrarchuslabrax*) and a low(meagre, *Argyrosomus regius*) cortisol responsivespecies, in different water temperatures. Aquaculture Research, 2015, 1–15.

Samaras A., Papandroulakis N., Lika K., Pavlidis M., 2018. Water temperature modifies the acute stress response of European sea bass,*Dicentrarchuslabrax* L. (1758). https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.006.

Sopinka M., Donaldson M., O'Connor C., Suski S., Cooke S., 2016. Stress indication in fish. Biology of Stress in Fish: Volume 35.http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4

Tort, L., Montero, D., Robaina, L., Fernandez-Palacios, H. & Izquierdo, M. S.,2001. Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream Sparus aurata Linnaeus, 1758. Aqua. Res. 32, 593–598 (2001).

Vandeputte L., Gagnaire P., A., Allal F., 2019. The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. The Authors. Animal Genetics published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Stichting International Foundation for Animal Genetics., doi: 10.1111/age.12779

Young, T., Walker, S.P., Alfaro, A.C., 2019. Impact of acute handling stress, anaesthesia, and euthanasia on fish plasma biochemistry: implications for veterinary screening and metabolomic sampling. *Fish PhysiolBiochem* **45,** 1485–1494 (2019). https://doi.org/10.1007/s10695-019-00669-8

Zanuy S., Carrillo M., Alicia F.,Rodrıguez L., Blazquez M., Ramos J., Piferrer F., 2001. Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax).* Aquaculture 202 2001 187–203.