

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση του εμπλουτισμού των σιτηρεσίων με νανογαλάκτωμα
αιθέριων ελαίων στην ιστολογία του πεπτικού αδένος των σαλιγκαριών
Cornu aspersum maximum»**

Καρατζά Θεοδώρα

ΒΟΛΟΣ 2024

**«Επίδραση του εμπλουτισμού των σιτηρεσίων με νανογαλάκτωμα αιθέριων ελαίων
στην ιστολογία του πεπτικού αδένος των σαλγκαριών *Cornu aspersum maximum*»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Χατζηιωάννου Μαριάνθη, Αν. Καθηγήτρια, Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**.

2) Δημήτριος Βαφείδης, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

3) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Αν. Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα, κα Μαριάνθη Χατζηιωάννου για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κο Βαφείδη Δημήτριο και κο Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Αποστολογάμβρου Χρυσούλα για τη βοήθειά της όσον αφορά στον τομέα του εργαστηρίου ιστολογίας, καθώς επίσης τον κο Αποστόλου Κωνσταντίνο και την κα Αϋφαντή Σταυρούλα για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή στήριξη και κατανόησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πραγματοποιήθηκε διατροφικό πείραμα εμπλουτισμού σιτηρεσίων με νανογαλάκτωμα μείγματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης, λεβάντας, γαρύφαλλου, δεντρολίβανου και αρτεμίσιας) σε σαλιγκάρια του είδους *Cornu aspersum maximum*. Προετοιμάστηκαν τέσσερα σιτηρέσια, ο μάρτυρας (Μ) που αποτελούνταν από εμπορική ορνιθοτροφή με προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου σε ποσοστό 30%, τα Σ1, Σ3 και Σ5 τα οποία παρασκευάστηκαν εμπλουτίζοντας το μάρτυρα με νανογαλάκτωμα σε ποσοστά 1% (1ml/Kg τροφής), 3% (3ml/Kg τροφής) και 5% (5ml/Kg τροφής) αντίστοιχα. Σε κάθε σιτηρέσιο αντιστοιχούσαν 500 σαλιγκάρια, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστό διαμέρισμα διχτυοκήπιου ανά σιτηρέσιο. Το πείραμα διήρκησε 60 ημέρες, στο πέρας των οποίων συλλέχθηκαν όλα τα σαλιγκάρια, έγινε καταμέτρηση και πάρθηκαν 4 ανά σιτηρέσιο για ιστολογικό έλεγχο του πεπτικού αδένος. Ο πεπτικός αδένος των σαλιγκαριών που τράφηκαν με τη δίαιτα Μ παρουσίασε φυσιολογική μορφολογία, με τη Σ1 ελαφρά διογκωμένους ηπατικούς αγωγούς και περιστασιακά έντονη παρουσία σφαιριδίων ασβεστίου στα ασβεστοκύτταρα, με τη Σ3 απόπτωση και δευτερογενή νέκρωση των πεπτικών κυττάρων, με τη Σ5 νέκρωση πεπτικών κυττάρων και παρουσία πολλών σφαιριδίων ασβεστίου στα ασβεστοκύτταρα. Η Σ1 αποδείχθηκε ιδανική συγκριτικά με τις υπόλοιπες εμπλουτισμένες δίαιτες καθώς δεν προκάλεσε δυσμενείς επιπτώσεις στον ιστό του πεπτικού αδένος.

Λέξεις κλειδιά: *Cornu aspersum maximum*, εμπλουτισμός σιτηρεσίου, αιθέρια έλαια, νανογαλάκτωμα, πεπτικός αδένος, απόπτωση, νέκρωση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 <i>Cornu aspersum</i>	1
1.2 Συστηματική κατάταξη	2
1.3 Εμπορική αξία σαλιγκαριών.....	3
1.4 Διατροφή σαλιγκαριών.....	4
1.5 Πεπτικό σύστημα.....	5
1.6. Πεπτικός αδένας.....	6
1.6.1 Δομή – Λειτουργία ανά τύπο κυττάρου.....	6
1.7 Αιθέρια έλαια σε υδατοκαλλιέργεια	10
1.7.1 Σύνθεση	10
1.7.2 Αντιβιοτικές – Αντιπαρασιτικές ιδιότητες	10
1.7.3 Αναισθητικές ιδιότητες	11
1.7.4 Ως πρόσθετα σε σιτηρέσια	11
1.7.5 Τρόπος λειτουργίας	13
1.7.6 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα χρήσης.....	14
1.7.7 Νανογαλακτώματα	15
1.8 Μελέτες με αιθέρια έλαια σε σαλιγκάρια.....	16
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 Πειραματικές τροφές με χρήση νανογαλακτώματος αιθέρων ελαίων	21
2.2 Προετοιμασία χώρου εκτροφής.....	22
2.3 Δειγματοληψίες	22
2.4 Ανατομή – Δείγματα για αναλύσεις.....	23
2.5 Ιστολογική ανάλυση πεπτικού αδένος	23
2.5.1 Απομόνωση ιστού.....	24
2.5.2 Μονιμοποίηση	24
2.5.3 Αφυδάτωση σε Ιστοκινέτα	24
2.5.4 Έγκλειση ιστών σε παραφίνη.....	25
2.5.5 Τεχνική κοπής ιστολογικών τομών.....	25
2.5.6 Αποπαραφίνωση, χρώση και επικάλυψη	26
2.5.7 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο.....	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 Μάρτυρας.....	28
3.2 Σ1.....	29

3.3 Σ3.....	31
3.4 Σ5.....	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38
7. ABSTRACT	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σαλιγκάρια είναι μέλη του φύλου Mollusca στο οποίο ανήκουν τουλάχιστον 80.000 είδη και αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο φύλο στο ζωικό βασίλειο. Μέλη αυτής της ομάδας βρίσκονται σε όλο τον κόσμο. Διακρίνονται σε υδρόβια και χερσαία (Conte, 2015). Ως χερσαία γαστερόποδα χαρακτηρίζονται περίπου 35.000 είδη και αυτό τα καθιστά μία από τις πιο επιτυχημένες και ποικιλόμορφες ομάδες (Barker, 2001). Τα εδώδιμα είδη χερσαίων σαλιγκαριών δεν ξεπερνούν παγκοσμίως τα 30 είδη, τα οποία κατανέμονται σε οκτώ οικογένειες, τις Achatinidae, Ampullariidae, Bulimulidae, Clausilidae, Helicidae, Orthalicidae, Sphincterochilidae και Strophocheilidae. Από τις οικογένειες αυτές τα περισσότερα και σημαντικότερα εδώδιμα και εμπορεύσιμα είδη συναντώνται στις οικογένειες Helicidae, Achatinidae και Ampullariidae. Τα εδώδιμα είδη της οικογένειας Ampullariidae, που είναι σαλιγκάρια του γλυκού νερού, ανήκουν κυρίως στο γένος *Pomacea*, απαντούν στη Νότια Αμερική και έχουν εισαχθεί, επίσης, σε χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας. Τα είδη της οικογένειας Achatinidae εκτρέφονται στην Αφρική και στη Νοτιοανατολική Ασία, ενώ πρόσφατα έχουν εγκατασταθεί καλλιέργειες και σε Ευρωπαϊκές χώρες (Μεγάλη Βρετανία). Στην Ευρώπη και Βόρεια Αμερική υπάρχουν γύρω στα 20 εδώδιμα και εμπορεύσιμα είδη σαλιγκαριών της οικογένειας Helicidae (Χατζιωάννου & Στάικου, 2015). Από τα είδη σαλιγκαριών που ζουν στη φύση στην Ευρώπη, περίπου δώδεκα είναι βρώσιμα και μόνο τέσσερα έως πέντε διατίθενται στο εμπόριο. Από αυτά, το *Cornu aspersum* καλύπτει το 40% της αγοράς, το *Helix pomatia* το 28%, το *Helix lucorum* το 22%, και το *Eobania vermiculata* το 8,5% (Rygała-Galewska *et al.*, 2020).

1.1 *Cornu aspersum*

Το εδώδιμο χερσαίο σαλιγκάρι *Cornu aspersum* (Müller, 1774) (προηγουμένως *Helix aspersa*) είναι ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα στυλοματοφόρα γαστερόποδα. Έχουν μελετηθεί διάφορες πτυχές της βιολογίας, της οικολογίας και της γενετικής του

διεθνώς και στη χώρα μας, καθώς αυτό το είδος είναι κύριο αντικείμενο εκτροφής (Kougiagka *et al.*, 2022b, Apostolou *et al.*, 2023).

Είναι ευρέως γνωστό στην Ελλάδα ως «Κρητικός Κοχλίας» (Hatzioannou *et al.*, 2014) και προέρχεται από χώρες της Μεσογείου. Περιλαμβάνει ένα σύνολο βορειοαφρικανικών ενδημικών μορφών και υποειδών που περιγράφηκαν στις αρχές του 20ου αιώνα με βάση τα χαρακτηριστικά του κελύφους. Αυτό το πολυτυπικό είδος χωρίζεται σε δύο υποείδη, το εκτρεφόμενο «gros-gris» ή *Cornu aspersum maximum*, του οποίου η προέλευση εξακολουθεί να είναι αμφίβολη, και το κοινό «petit-gris» ή *Cornu aspersum aspersum* (Guiller *et al.*, 2012). Το *C.a.aspersum* υπάρχει άφθονο σε όλα τα ενδιαιτήματα που είναι διαταραγμένα από τον άνθρωπο. Παρατηρείται κυρίως σε περιοχές με μεσογειακό, εύκρατο ή ακόμη και υποτροπικό κλίμα. Η παρουσία του αναφέρεται στην Αμερική καθώς και στην Αυστραλία και στην Ασία (Guiller & Madec, 2010). Αυτό το σχετικά μεγάλο χερσαίο σαλιγκάρι έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο από τον άνθρωπο. Θεωρείται πλέον χωροκατακτητικό και είναι γεωργικό παράσιτο (Guiller *et al.*, 2012).

1.2 Συστηματική κατάταξη

Η συστηματική κατάταξη του *Cornu aspersum* (Müller, 1774) σύμφωνα με το GBIF Data Portal Classification (2006) είναι η παρακάτω:

- > Βασίλειο: Animalia
- > Φύλο: Mollusca
- > Κλάση: Gasteropoda
- > Υπόκλαση: Pulmonata
- > Τάξη: Stylommatophora
- > Υπόταξη: Holopoda
- > Υπεροικογένεια: Helicacea
- > Οικογένεια: Helicidae
- > Γένος: Cornu
- > Είδος: *Cornu aspersum*

1.3 Εμπορική αξία σαλιγκαριών

Μέχρι το 2050, ο ανθρώπινος πληθυσμός προβλέπεται να έχει φτάσει τα 9 δισεκατομμύρια. Οι εκθέσεις του FAO εκτιμούν ότι η παραγωγή τροφίμων θα αυξηθεί κατά 70%. Η κύρια πρόκληση για τους παραγωγούς τροφίμων είναι η παραγωγή πρωτεΐνης, κυρίως ζωικής προέλευσης, η ζήτηση της οποίας ολοένα αυξάνεται. Το υψηλό κόστος, η μεγάλη κατανάλωση νερού και η περιβαλλοντική ρύπανση (άζωτο - αέρια θερμοκηπίου) εντείνουν το ζήτημα της παραγωγής ζωικής πρωτεΐνης (Dickie, 2014). Επομένως καθίσταται αναγκαία η εφαρμογή καινοτόμων, ασφαλών τεχνολογιών βιώσιμης παραγωγής και εναλλακτικής κτηνοτροφίας, κυρίως ασπόνδυλων, συμπεριλαμβανομένων των μαλακίων (Ghosh *et al.*, 2016, Zucaro *et al.*, 2016).

Τα χερσαία σαλιγκάρια και τα προϊόντα τους επιλέγονται από αυξανόμενο αριθμό καταναλωτών σε Ευρωπαϊκές χώρες, τη Νοτιοανατολική Ασία και την Αμερική, όπου παρατηρείται μεγάλη ζήτηση για βρώσιμα σαλιγκάρια. Σε πολλές ευρωπαϊκές παράκτιες χώρες (Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία), τα χερσαία σαλιγκάρια αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της εθνικής κουζίνας και η ζήτηση για την παραγωγή τους είναι σταθερά υψηλή (Elmslie, 1989).

Συμπεριλαμβάνονται και στην παραδοσιακή κουζίνα και της Ελλάδας, ιδιαίτερα στην περιοχή της Κρήτης. Εκτιμάται ότι η εγχώρια ευρωπαϊκή αγορά μπορεί να καλύψει μόνο το 60–70% της ζήτησης αυτού του προϊόντος (Massari, 2014). Το 2016 η κατανάλωση σαλιγκαριών στον κόσμο ανήλθε σε 43.000 τόνους και μέχρι το 2025 προβλέπεται ότι θα αυξηθεί στους 50.000 τόνους. Η μεγαλύτερη κατανάλωση εντός Ευρώπης καταγράφεται στην Ισπανία, τη Γαλλία και την Πορτογαλία. Το Μαρόκο διαδραμάτισε βασικό ρόλο στην παραγωγή το 2020 ακολουθούμενο από τη Λιθουανία και τη Ρουμανία. Οι μεγαλύτεροι εισαγωγείς σαλιγκαριών είναι η Γαλλία, η Ισπανία και η Ρουμανία (Rygało-Galewska *et al.*, 2020).

Ως αναπτυξιακή δραστηριότητα στην Ελλάδα, η σαλιγκαροτροφία αποτελεί εναλλακτική πηγή εισοδήματος ακόμη και σε περιοχές με γεωργικές εκτάσεις χαμηλής παραγωγικότητας. Σύμφωνα με διαθέσιμα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Ελλάδα, το 2021 λειτουργούσαν 131 εκτροφεία σαλιγκαριών που καταλάμβαναν 578.000 m² (Apostolou *et al.*, 2021).

Τα βρώσιμα χερσαία Γαστερόποδα αποτελούν ένα υψηλής αξίας προϊόν διατροφής

(κρέας σαλιγκαριών, escargot), ενώ αποτελούν πηγή για την παραγωγή ειδικών προϊόντων (χαβιάρι σαλιγκαριών, βλέννα, βιοδραστικές ουσίες από το σώμα ή τις εκκρίσεις των σαλιγκαριών, κολλαγόνο) μεγάλης εμπορικής αξίας με σταθερή ζήτηση και εξασφαλισμένες αγορές (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

1.4 Διατροφή σαλιγκαριών

Σε ελεύθερο περιβάλλον, στη διατροφή των περισσότερων χερσαίων ειδών τα φύλλα φυτών είναι τα πιο συνήθη, ακολουθούμενα από μανιτάρια, ζώα και χώμα. Μερικές φορές καταναλώνουν φύκια, βρύα, λειχήνες. Ως τρόφιμα έχουν καταγραφεί ρίζες, βλαστοί, φύλλα, άνθη, γύρη, καρποί, σπόροι και ξύλα που σαπίζουν. Οι περισσότερες εργαστηριακές δοκιμές σίτισης έχουν γίνει με πράσινα φύλλα, ενώ σπάνια έχουν δοκιμαστεί μαραμένοι ή σάπιοι φυτικοί ιστοί (Barker, 2001). Γενικά, ένας τρόπος για να καλυφθούν οι διαιτητικές απαιτήσεις των σαλιγκαριών σε θρεπτικά συστατικά είναι να συμπεριληφθεί μεγάλη ποικιλία τροφών στη διαίτά τους. Η καταλληλότερη σύσταση του σιτηρεσίου για τη διατροφή των σαλιγκαριών συνδέεται με προκαθορισμένες αναλογίες στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Διάφορες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς αποδεικνύουν ότι οι σύνθετες δίαιτες είναι ανώτερες από αυτές που περιέχουν μόνο ένα συστατικό, και οδηγούν σε ταχύτερη αύξηση και χαμηλότερη θνησιμότητα. Η γνώση που υπάρχει σήμερα για τις απαιτήσεις σε διαιτητική πρωτεΐνη των εκτρεφόμενων ειδών σαλιγκαριών, κυρίως του *Cornu aspersum*, είναι ελλιπής. Επομένως, ένα σιτηρέσιο που αποτελείται από δύο ή περισσότερα συστατικά (σύνθετες δίαιτες) μπορεί να πλησιάσει την ιδανική σύσταση (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

Τα συστατικά για σύμψηκτα σαλιγκαριών είναι άλευρα δημητριακών (καλαμπόκι, κριθάρι, βρώμη), πίτουρο σιταριού, σόγιας, αποξηραμένα πράσινα φύλλα, πηγή ασβεστίου (συνήθως ασβεστόλιθος), λαδιού και μείγμα βιταμινών. Στα νεαρά σαλιγκάρια συνήθως χορηγείται ορνιθοτροφή, ενώ κατά την πάχυνση η ανάγκη για περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της τροφής αυξάνεται και έτσι χρησιμοποιούνται μείγματα για εκτροφή χοίρων (Rygało-Galewska et al., 2020).

1.5 Πεπτικό σύστημα

Τα σαλιγκάρια έχουν μαλακό σώμα, όπως όλα τα μαλάκια, το οποίο προστατεύεται από το κέλυφός τους. Η γενική οργάνωση του σώματός τους ακολουθεί το κοινό αρχιτεκτονικό πρότυπο οργάνωσης των μαλακίων. Το σώμα τους χωρίζεται σε δύο τμήματα. Το ένα τμήμα περιλαμβάνει το πόδι και το κεφάλι, και το άλλο τμήμα τη σπλαχνική μάζα. Το τμήμα κεφάλι-πόδι περιλαμβάνει τα αισθητήρια όργανα, τα εγκεφαλικά γάγγλια, την απαρχή του πεπτικού συστήματος και το όργανο κίνησης. Η σπλαχνική μάζα περιλαμβάνει το υπόλοιπο πεπτικό σύστημα, τα νεύρα και γάγγλια, το κυκλοφορικό, το απεκκριτικό, το αναπνευστικό και το αναπαραγωγικό σύστημα.

Η σπλαχνική μάζα βρίσκεται συνεχώς προστατευμένη στο εσωτερικό του κελύφους, ενώ το πόδι, με τα όργανα που φέρει, μπορεί να εκβάλει από το κέλυφος όταν το σαλιγκάρι έρπει, τρέφεται ή ζευγαρώνει, και μπορεί να αποσύρεται στο εσωτερικό του κελύφους σε περιόδους ανάπαυσης. Η ένωση του σώματος του σαλιγκαριού με το κέλυφός του, αλλά και η απόσυρση του ποδιού μέσα στο κέλυφος, γίνεται με τη σύσπαση ενός επισπαστήρα μυ, που ονομάζεται μυς του στυλίσκου και προσφύεται στον άξονα περιέλιξης του κελύφους, που ονομάζεται στυλίσκος (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

Το πεπτικό σύστημα των χερσαίων σαλιγκαριών αποτελείται από τον πεπτικό σωλήνα και τους αδένες που είναι προσαρτημένοι σε αυτόν. Επιτελεί τρεις ρόλους (Barker, 2001) :

- την πρόσληψη, τη μεταφορά και την αποθήκευση της τροφής,
- την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών από τον οργανισμό, και
- τον σχηματισμό των απεκκριμάτων

Ο πεπτικός σωλήνας αποτελείται από πέντε τμήματα, τη στοματική μάζα που βρίσκεται μέσα στη στοματική κοιλότητα, τον οισοφάγο με τον προστόμαχο, τον στόμαχο, το έντερο και το απευθυσμένο, που καταλήγει στην έδρα. Οι δύο προσαρτημένοι αδένες είναι οι σιελογόνοι αδένες στο πρόσθιο τμήμα του πεπτικού σωλήνα και ο πεπτικός αδένας ή ηπατοπάγκρεας στο οπίσθιο τμήμα του (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

1.6. Πεπτικός αδένας

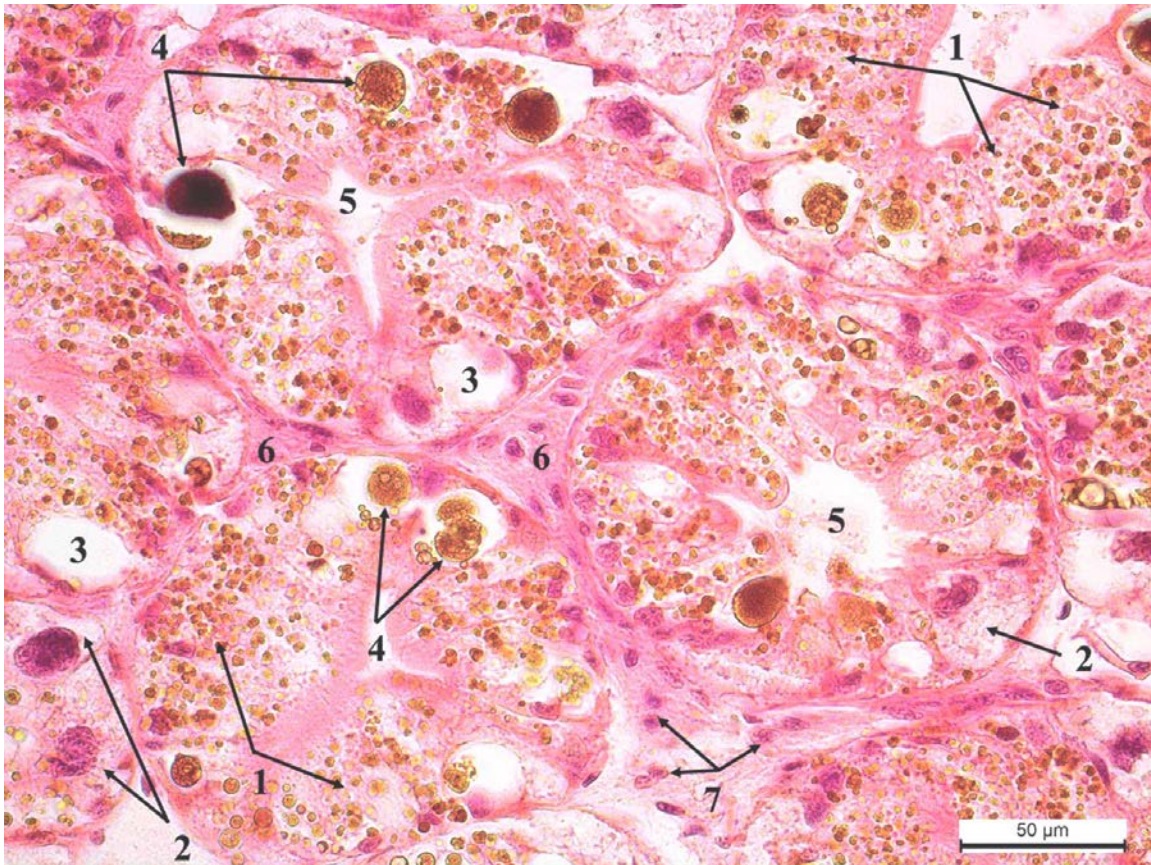
Οι τροφές παραμένουν στον στόμαχο μόνο για σύντομο χρονικό διάστημα. Μικρά τεμάχια τροφής και διαλυμένο υλικό περνούν στον πεπτικό αδένα με τη βοήθεια περισταλτικών κινήσεων, ενώ τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σωματίδια κατευθύνονται μέσα στο έντερο με την κίνηση των κροσσωτών πτυχώσεων γύρω από τα ανοίγματα του ηπατικού πόρου. Οι πτυχώσεις αυτές λειτουργούν ως ένα αποτελεσματικό φίλτρο που κατακρατεί τα μεγάλου μεγέθους σωματίδια και επιτρέπει μόνο σε σωματίδια μικρότερα από 0,1 μm να εισέλθουν στον πεπτικό αδένα. Στον πεπτικό αδένα λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρική πέψη της τροφής, απορρόφηση των διαλυτών ουσιών και συγκέντρωση των άπεπτων υπολειμμάτων σε «φαγοσώματα», τα οποία κατευθύνονται στους ηπατικούς αγωγούς. Επίσης, τα κύτταρα του συνδετικού ιστού μεταξύ των λοβών του πεπτικού αδένα αποτελούν θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου (Χατζηιωάννου & Στάικου, 2015).

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για την ύπαρξη ενδοκυτταρικής δραστηριότητας στον πεπτικό αδένα στα γαστερόποδα. Συγκεκριμένα, η σύντηξη κυστιδίων εντός των πεπτικών κύτταρων δημιουργεί τα λεγόμενα «φαγοσώματα», τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε «φαγολυσοσώματα» μετά από σύντηξη με μικρά πλούσια σε ένζυμα «πρωτολυσοσώματα» που παράγονται από τα σύμπλοκα Golgi. Η πέψη του υλικού μέσα στα φαγολυσοσώματα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαλυτού υλικού και τη συσσώρευση δύσπεπτου υλικού από το οποίο σχηματίζονται υπολειμματικά σώματα. Η συνεχής ενδοκυτταρική πέψη έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση «φαγοσωμάτων», τα οποία τελικά αποσπώνται και απορρίπτονται στους ηπατικούς πόρους μαζί με μικρές ποσότητες κυτταροπλάσματος από την κορυφή των κυττάρων (Dimitriadis & Hondros, 1992, Dimitriadis & Liosi, 1992). Επίσης χημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο πεπτικός αδένας λειτουργεί ως κύρια αποθήκη γλυκογόνου (Goddard & Martin, 1966).

1.6.1 Δομή – Λειτουργία ανά τύπο κυττάρου

Όπως και σε άλλα μαλάκια, ο πεπτικός αδένας είναι ο μεγαλύτερος αδένας του πεπτικού συστήματος στα γαστερόποδα. Αποτελείται από πολυάριθμα τυφλά λόβια που συνδέονται με ένα σύστημα διακλαδωμένων αγωγών οι οποίοι επικοινωνούν με το

στομάχι. Αυτά τα λόβια αποτελούνται από ένα επιθήλιο μονής στιβάδας που περιβάλλεται από ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού (Lobo-da-Cunha, 2019).



Εικόνα 1. Δομή των λοβίων πεπτικού αδένα *Cornu aspersum* (χρώση H & E): πεπτικά κύτταρα (1), κύτταρα ασβεστίου (2), κενोटόπια χωρίς περιεχόμενο (3), κενोटόπια με καφέ κόκκους (4), αγωγός (5), συνδετικός ιστός (6), κύτταρα συνδετικού ιστού (7), (Μεταφρασμένη από Zaitsev *et al.*, 2020).

Τα **πεπτικά κύτταρα** είναι τα πιο άφθονα στον πεπτικό αδέν. Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από έντονη ενδοκυτταρική δραστηριότητα και ενδοκυτταρική πέψη (Dimitriadis, 2001). Ουσίες που συλλέγονται από τον πεπτικό αυλό προσκολλώνται στη βάση των μικρολάχνων των πεπτικών κυττάρων. Επομένως λεπτά σωματίδια που προκύπτουν από την εξωκυτταρική πέψη απορροφώνται και συγκεντρώνονται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Έπειτα αποκκολώνται από την κυτταρική μεμβράνη και

μεταφέρουν τις συγκεντρωμένες ουσίες στα ενδοσώματα που βρίσκονται στην κορυφή του κυττάρου (Lobo-da-Cunha, 2019).

Οι ουσίες που συλλέγονται από τον πεπτικό αυλό εν τέλει καταλήγουν στα λυσοσώματα των πεπτικών κυττάρων όπου λαμβάνουν χώρα τα τελικά στάδια της πέψης (Lobo-da-Cunha *et al.*, 2018). Η σύντηξη λυσοσωμάτων δημιουργεί πολύ μεγάλα κενοτόπια που περιέχουν άπεπτα υπολείμματα. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα γεμίζουν με πολύ μεγάλα κενοτόπια που περιβάλλονται από λεπτά νήματα κυτταροπλάσματος. Τα κύτταρα του πεπτικού αδένου που χαρακτηρίζονται από μεγάλα κενοτόπια αντιστοιχούν στα **απεκκριτικά κύτταρα** που αναφέρονται σε ορισμένα είδη, αλλά φαίνεται να είναι η τελική φάση απέκκρισης των πεπτικών κυττάρων και όχι ένας ξεχωριστός κυτταρικός τύπος (Walker 1970, Dimitriadis & Konstantinidou 2002, Lobo-da-Cunha *et al.* 2018). Στο τέλος της ενδοκυτταρικής πέψης, αυτά τα κύτταρα απελευθερώνουν τις άπεπτες ουσίες στον πεπτικό αυλό και μέσω των αγωγών του πεπτικού αδένου μεταφέρονται πίσω στο στομάχι.

Τα **κύτταρα ασβεστίου** εμφανίζονται είτε μεμονωμένα είτε σε ζεύγη στα πεπτικά λόβια. Έχουν πυραμιδοειδές σχήμα με στενά άκρα και ευρεία βάση. Τα κύτταρα ασβεστίου μπορεί να είναι πολυπύρηννα και διαθέτουν μεγάλους στρογγυλεμένους πυρήνες. Οι κόκκοι ασβεστίου που εμπεριέχουν είναι διαθλαστικά σώματα. Οι κόκκοι των κυττάρων ασβεστίου περιέχουν μεγάλες ποσότητες ιόντων, συνήθως Ca, P και Mg. Το ασβέστιο είναι απαραίτητο στοιχείο στη βιολογία του σαλιγκαριού, συμβάλλει κυρίως στις διαδικασίες κατασκευής και αναγέννησης του κελύφους. Είναι επίσης, μαζί με το φώσφορο, το πιο σημαντικό ιόν στη ρύθμιση του pH του. Εκτός από αυτά τα τρία κύρια ιόντα στους κόκκους, ίχνη άλλων μεταλλικών ιόντων όπως Zn, Fe, Cd και Pb έχουν επίσης ανιχνευθεί σε ποσότητες που σε άλλες ομάδες ζώων θα μπορούσαν να είναι θανατηφόρες. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι αυτοί οι κόκκοι αποτελούν έναν πολύ περίπλοκο μηχανισμό αποτοξίνωσης των κυττάρων, ο οποίος εξαλείφει τα εξαιρετικά τοξικά μέταλλα που προσλαμβάνουν τα σαλιγκάρια από το περιβάλλον όπου βρίσκονται (Dennis *et al.*, 2021). Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας επισκόπησης βιβλιογραφίας με μελέτες πεπτικού αδένου σε εδάδιμα είδη χερσαίων πνευμονοφόρων γαστερόποδων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Επισκόπηση βιβλιογραφίας μελέτης πεπτικού αδένος σε γαστερόποδα.

Εργασία	Μεθοδολογία	Είδος γαστερόποδου	Σκοπός εργασίας	Αποτέλεσμα
Mohammadein et al., 2013	• Συλλογή σαλιγκαριών από 1 ρυπασμένη (3), 1 σχετικά (2) και 1 καθόλου (1), περιοχές • Δείγματα εδάφους για έλεγχο συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων • Πεπτικοί αδένες χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση μετάλλων, ιστολογικές και ιστοχημικές αναλύσεις	<i>Eobania vermiculata</i>	• Σύγκριση εικόνας πεπτικού αδένος <i>E. Vermiculata</i> από 3 διαφορετικές περιοχές μιας πόλης • Εξετάστηκαν ιστολογικές και ιστοχημικές αλλοιώσεις του αδένος λόγω συσσώρευσης βαρέων μετάλλων	Περιοχή (2): • Δυσδιάκριτα όρια μεταξύ των πεπτικών κυττάρων και των κυττάρων ασβεστίου • Αύξηση αριθμού εκκριτικών κυττάρων, και μεγέθους κόκκων, ακανόνιστο σχήμα κενοτοπίων Περιοχή (3): • Οίδημα επιθηλιακών κυττάρων με διόγκωση πυρήνα • Αύξηση αριθμού και μεγέθους απεκκριτικών κυττάρων
Zaitsev et al., 2020	ΧΡΩΣΕΙΣ • Αιματοξυλίνη και Ιωσίνη • Heidenhain's azan • Weigert's resorcin-fuchsin και aldehyde-fuchsin έπειτα από Gabe-Dyban • PAS έπειτα από McManus • Potassium ferricyanide έπειτα από Schmorl ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ • ImageTool • WCIF ImageJ • StatPlus 2008 στατιστική	<i>Cornu aspersum</i>	• Προηγμένη μορφομετρική μελέτη της δομής του πεπτικού αδένος • Ιδιαιτερότητες της σχέσης μεταξύ των σχετικών παραμέτρων	Κατά μέσο όρο: • Η αναλογία των πεπτικών λόβιων προς τον ιστό που τα περιβάλλει ήταν 4 /1 • Το περίβλημα του αδένος είχε τρία στρώματα: επιθηλιακό, μυϊκό και ίνες κολλαγόνου • Τα κύτταρα ασβεστίου αποτελούσαν το 15,5 % των πεπτικών λόβιων
Farfar et al., 2022	• 4 ομάδες: α) μάρτυρας, β) κάδμιο, γ) μυκητοκτόνο, δ) κάδμιο + μυκητοκτόνο • Εμβάπτιση φύλλων μαρουλιού σε κάδμιο ή/και μυκητοκτόνο • Έπειτα σίτιση σαλιγκαριών	<i>Cantareus aspersus</i>	Κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται όταν προκαλείται στρες στο σαλιγκάρι εξαιτίας των 2 ουσιών	ΚΑΔΜΙΟ 15 μέρες: Μείωση του αριθμού των πεπτικών κυττάρων 30 ημέρες: Διευρυμένα σφαιρίδια ασβεστίου εντός κυττάρων ασβεστίου, κυτταρικό οίδημα συνοδευόμενο από ρήξη της μεμβράνης, εμφάνιση νέκρωσης στα κύτταρα 90 ημέρες: Απόπτωση, νεκρωτικά κύτταρα ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟ 30 ημέρες: Κύτταρα διογκωμένα με διάχυτο περιεχόμενο 90 ημέρες: Απόπτωση, νεκρωτικά κύτταρα ΚΑΔΜΙΟ + ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟ 15 μέρες: Εκφυλισμός πεπτικών κυττάρων 30 ημέρες: Κυτταρική υπερτροφία, διεύρυνση του πόρου, απόπτωση 90 ημέρες: Πλήρως νεκρωτικά κύτταρα
Danilova et al., 2022	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ • Αμέσως μετά τη νάρκη • 14 ημέρες μετά την αφύπνιση • Δραστήρια περίοδο μήνα Ιούλιο	<i>Helix aspersa maxima</i> <i>Helix aspersa muller</i> <i>Helix pomatia</i>	Μελέτη δομής πεπτικών κυττάρων στα σαλιγκάρια σε διαφορετικές περιόδους μετά την αφύπνιση: • Αμέσως μετά • 14 ημέρες • Σε δραστήρια περίοδο μήνα Ιούλιο	• Κατά τη νάρκη: Πλήρης απώλεια της πεπτικής λειτουργίας και μετατροπή των πεπτικών κυττάρων σε εκκριτικά. Τα μεταβολικά προϊόντα δεν απεκκρίνονται στο περιβάλλον. • 14 ημέρες από αφύπνιση και έπειτα: Διεγείρεται η διαφοροποίηση των πεπτικών κυττάρων, η λειτουργική δραστηριότητα των εκκριτικών κυττάρων. Η δομή και η λειτουργία του πεπτικού αδένος αποκαθίσταται πλήρως.

1.7 Αιθέρια έλαια

1.7.1 Σύνθεση

Τα φυτά περιέχουν προϊόντα από πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολισμούς που έχουν μεγάλη σημασία για την επιβίωσή τους. Ο δευτερογενής μεταβολισμός των φυτών συμβάλλει στην επιτυχή αύξησή τους σε χερσαία περιβάλλοντα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συσχετίζουν τα φυτά με το οικοσύστημά τους, επειδή οι χρωστικές και οι αρωματικές ενώσεις που προσδίδουν χρώμα και άρωμα στα αναπαραγωγικά όργανα και τους καρπούς τους, προσελκύουν επικονιαστές και ευνοούν τη διασπορά των σπόρων από τα εμπλεκόμενα ζώα. Επιπλέον, οι πτητικές ενώσεις μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών μπορούν να απωθήσουν φυτοφάγους οργανισμούς (Tavares-Dias, 2018).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να παραχθούν σε διάφορα μέρη του φυτού (φύλλα, μίσχοι, ρίζες, άνθη και σπόροι) και οι συγκεντρώσεις τους επηρεάζονται από το είδος του φυτού, το στάδιο ανάπτυξής του, την εποχικότητα, τις κλιματικές και γεωγραφικές συνθήκες και τη μέθοδο εκχύλισης (Tavares-Dias, 2018).

Τα αιθέρια έλαια (ΑΕ) είναι πολύπλοκα μείγματα πτητικών ενώσεων που παράγονται από διαφορετικά είδη φυτών (Luis *et al.*, 2019), πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες των φαρμακευτικών φυτών και διαθέτουν βιοδραστικές ιδιότητες για χρήση ως φυτοθεραπευτικός παράγοντας σε βιώσιμη εκτροφή. Τα τερπένια, τα τερπενοειδή, τα φαινυλοπροπένια και τα ισοθιοκυανικά είναι οι βασικές χημικές ομάδες που προσδιορίζονται στα αιθέρια έλαια (Dawood *et al.*, 2021).

1.7.2 Αντιβιοτικές – Αντιπαρασιτικές ιδιότητες

Επί του παρόντος, περισσότεροι από 3000 τύποι αιθέριων ελαίων είναι γνωστοί, αλλά μόνο το ένα δέκατο περίπου από αυτά είναι κατάλληλα για χρήση στις βιομηχανίες φαρμάκων, διατροφής και καλλυντικών (Sharifi-Rad *et al.*, 2017), όπως επίσης και στην κτηνιατρική.

Η χρήση των αιθέριων ελαίων έχει διαδοθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια, καθώς πολλά από αυτά έχουν αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές, αναλγητικές,

αντικαρκινικές, εντομοκτόνες, σπασμολυτικές, ηπατοπροστατευτικές, αυξητικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες, όπως επίσης λειτουργούν κατά των ενδοπαράσιτων και των εξωπαράσιτων ζώων και ανθρώπων που είναι ανθεκτικά στα συμβατικά φάρμακα (Tavares-Dias, 2018).

Όσον αφορά στις υδατοκαλλιέργειες, για την εξάλειψη βακτηριακών και παρασιτικών ασθενειών διάφορα συνθετικά αντιβιοτικά, χημικά φάρμακα, εμβόλια και χημειοθεραπευτικά χρησιμοποιούνται σε υψηλά ποσοστά κάθε χρόνο (El-Basuini *et al.*, 2021). Η χρήση αυτών των χημικών ουσιών προκαλεί μαζική θανάτωση και ωφέλιμων υδρόβιων βακτηρίων (Hasan *et al.*, 2018) οδηγώντας σε παθογόνα ανθεκτικά σε πολλά φάρμακα και αφήνει υπολείμματα στα ψάρια τα οποία μπορούν να καταλήξουν στον άνθρωπο. Αυτά είναι τα πιο επείγοντα προβλήματα για τη βιωσιμότητα των υδατοκαλλιεργειών. Η θεραπεία μολυσματικών και παρασιτικών ασθενειών με χρήση φυσικών ουσιών είναι βιώσιμη εναλλακτική λύση (Dawood *et al.*, 2021).

1.7.3 Αναισθητικές ιδιότητες

Το γαρυφαλέλαιο είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αναισθητικό φυτικής προέλευσης στην υδατοκαλλιέργεια. Άλλες μελέτες έχουν επίσης διεξαχθεί σχετικά με τη χρήση αιθέριων ελαίων βασιλικού, θυμαριού, μέντας, δεντρολίβανου, λεβάντας, σιτρονέλλας, λουίζας και καμφοράς για διάφορα είδη ψαριών (Aydin & Barbas, 2020).

1.7.4 Ως πρόσθετα σε σιτηρέσια

Τα αιθέρια έλαια έχουν τη δυνατότητα να γίνουν μια νέα γενιά προϊόντων που συμπεριλαμβάνονται στη διατροφή των ζώων για την υγεία τους, παρουσιάζουν θετικές επιπτώσεις στην πέψη, στη μικροβιακή κοινότητα του εντέρου, στην ανάπτυξη των ζώων και τη γενικότερη ευημερία τους. Τα φυτοχημικά αναγνωρίζονται ευρέως ως ασφαλή για τα ζώα, τους καταναλωτές και το περιβάλλον. Αυτά τα προϊόντα έχουν μεγάλες δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας λόγω των ευεργετικών βιολογικών επιδράσεων που αναφέρονται σε υδρόβια είδη, όπως η αύξηση

της ανάπτυξης, η διέγερση της όρεξης, η ανοσοτροποποιητική και η αντιοξειδωτική δράση (Suttili *et al.*, 2018)

Εξαιτίας της ποικιλίας των διατροφικών συνηθειών τους, τα ψάρια (θαλάσσιων και γλυκών νερών) διαθέτουν μια πολύπλοκη και δυναμική κοινότητα εντερικών μικροοργανισμών η οποία αποτελείται από πολλά βακτηριακά γένη στο γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτή η βακτηριακή κοινότητα και οι μεταβολίτες της έχουν τεράστιες επιδράσεις στην κατάσταση της υγείας του ξενιστή μέσω της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων μεταβολικών λειτουργιών. Αυτή η βακτηριακή κοινότητα μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων στην πεπτική οδό που εμπλέκονται στη διέγερση του επιθηλιακού πολλαπλασιασμού, στην προώθηση του μεταβολισμού των θρεπτικών ουσιών και στις εγγενείς ανοσολογικές αποκρίσεις, ενώ αποτρέπει την πιθανή ανάπτυξη εντερικών διαταραχών και ανισορροπιών στην εντερική ομοιόσταση (Balcazar *et al.*, 2006). Η διατήρηση της λειτουργικότητας και της υγείας της γαστρεντερικής οδού παίζει καθοριστικούς ρόλους στη λειτουργία του σώματος τους ξενιστή, με κύριες λειτουργίες την προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς, την αποτελεσματική απορρόφηση θρεπτικών ουσιών και την ανοσολογική ρύθμιση (Laparra & Sanz, 2010).

Οι παραπάνω ιδιότητες οφείλονται στο ότι τα αιθέρια έλαια λειτουργούν ως πρεβιοτικά στο εντερικό περιβάλλον, ρυθμίζοντας έτσι τη βακτηριακή σύνθεση του εντέρου. Μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ποσότητα και τον τύπο των εκκρίσεων που παράγονται από τον εντερικό βλεννογόνο και να αλλάξουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εντερικού περιβάλλοντος, οδηγώντας σε ενισχυμένη αντοχή έναντι σε νόσους. Η διέγερση των εντερικών εκκρίσεων επιτρέπει στο μικροβίωμα του εντέρου να ρυθμίζει και να βελτιώνει την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. Αυτή η διέγερση μπορεί να παρέχει μια μεγαλύτερη σειρά αμινοξέων διαθέσιμη για πρωτεϊνοσύνθεση και έτσι να οδηγήσει σε αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου του σώματος του εκτρεφόμενου ζώου (Freccia *et al.*, 2014).

Γνωρίζουμε επίσης ότι τα αιθέρια έλαια λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες προστιθέμενα σε τροφές πουλερικών και χοίρων (Zhai *et al.*, 2018).

Η πρόσληψη τροφής στα πουλερικά παραμένει αμετάβλητη ή ελαφρώς μειωμένη με τη συμπερίληψη αιθέριων ελαίων. Σε αντίθεση με την πρόσληψη τροφής, παρατηρούνται συστηματικά βελτιώσεις στην αύξηση βάρους και στην αναλογία μετατροπής της τροφής. Αυτές οι θετικές επιδράσεις αποδίδονται σε δύο κοινά αποδεκτούς

μηχανισμούς: τη διέγερση της έκκρισης πεπτικών ενζύμων και τη σταθεροποίηση της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου, που οδηγεί σε βελτιωμένη χρήση της τροφής και μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης διαταραχών που σχετίζονται με την πέψη και το μεταβολισμό καταστέλλοντας την ανάπτυξη (Zhai et al., 2018).

Οι επιδράσεις των αιθέριων ελαίων στην πρόσληψη τροφής των χοίρων είναι διφορούμενες. Η αυξημένη πρόσληψη τροφής πιθανά σχετίζεται με τον βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης των ζώων, όπως συνήθως παρατηρείται με τα περισσότερα πρόσθετα που προάγουν ταχύτερη ανάπτυξη. Έχει καταγραφεί βελτιωμένη πεπτικότητα της τροφής έπειτα από εμπλουτισμό με αιθέρια έλαια. Η βελτίωση μπορεί να αποδοθεί στην ενισχυμένη έκκριση χολής και ενζύμων και σε κάποιο βαθμό στις μειωμένες ενδογενείς απώλειες θρεπτικών ουσιών (Zhai et al., 2018).

1.7.5 Τρόπος λειτουργίας

Λόγω του μεγάλου αριθμού των συστατικών τους, τα αιθέρια έλαια φαίνεται να μην έχουν συγκεκριμένους κυτταρικούς στόχους. Ως τυπικά λιπόφιλα, περνούν μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη, επηρεάζουν τη δομή διαφορετικών στρωμάτων πολυσακχαριτών, λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων και καθιστούν αυτά τα στρώματα διαπερατά (Bakkali *et al.*, 2008). Μελέτες στις οποίες έγινε ιστολογική ανάλυση στο γαστρεντερικό σωλήνα των νηματωδών που βρέθηκαν σε ψάρια, τα οποία εκτέθηκαν σε αιθέριο έλαιο θυμαριού (Giarratana *et al.*, 2014) σε R-limonene (Giarratana *et al.*, 2015) στο αιθέριο έλαιο του *Cymbopogon sp.* (Justino & Barros, 2008) όπως και σε γερανιόλη, κιτρονελλόλη, κιτράλη, καρβακρόλη και κουμιναλδεϋδη (Hierro *et al.*, 2004), έδειξαν αλλοίωση του γαστρεντερικού σωλήνα.

Ο μηχανισμός δράσης των αιθέριων ελαίων έναντι των παρασίτων δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η λιποφιλία αυτών των ενώσεων φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική βλάβη που προκαλείται από τα τερπένια των αιθερίων ελαίων. Αρκετοί συγγραφείς έχουν αποδείξει ότι η τοξική δράση κατά των βακτηρίων σχετίζεται με την ικανότητα των τερπενίων να διεισδύουν εύκολα στη λιπιδική στιβάδα των κυττάρων (Giarratana *et al.*, 2014). Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών των αιθερίων ελαίων και των βακτηριακών μεμβρανών οδηγεί σε δομικές αλλαγές (οίδημα,

συρρίκνωση, κενотоπιασμό) τροποποιώντας τη διαπερατότητα μεμβρανών και προκαλώντας απώλεια ιόντων και άλλων κυτταρικών περιεχομένων (Bakkali *et al.*, 2008). Η αλλοίωση που παρατηρείται στο έντερο των νηματωδών πιθανά σχετίζεται με τη συγκεκριμένη επίδραση των τερπενίων (Giarratana *et al.*, 2014).

1.7.6 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα χρήσης

Η χρήση παραγώγων φαρμακευτικών φυτών στην υδατοκαλλιέργεια παρουσιάζει αυξητική τάση σε όλο τον κόσμο λόγω των ιδιοτήτων βιοαποικοδόμησής τους, της διαθεσιμότητας και της ευκολίας στην καλλιέργεια. Επίσης δεν συσσωρεύονται σε ζωικούς ιστούς ως υπόλειμμα. Τα αιθέρια έλαια κυρίως διεισδύουν και δρουν στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων, αναστέλλουν τους μηχανισμούς δράσης τους αλλάζοντας τη μορφολογία των κυττάρων και προκαλούν παραμορφώσεις στα οργάνιδιά τους. Επιπλέον, οι συνεργιστικές επιδράσεις των διαφορετικών ενώσεων των αιθέριων ελαίων είναι ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό που οδηγεί σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με μεμονωμένες ενώσεις (Dawood *et al.*, 2021). Παρά τις χρήσιμες ιδιότητές τους, τα αιθέρια έλαια (ΑΕ) παρουσιάζουν ορισμένους σημαντικούς περιορισμούς στην εφαρμογή τους. Όπως και άλλες λιπόφιλες και αρωματικές ενώσεις, η διαλυτότητα των ΑΕ στο νερό είναι χαμηλή, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη χρήση τους σε υδάτινα μέσα. Άλλα μειονεκτήματα των ΑΕ είναι η χαμηλή τους σταθερότητα, η υψηλή ευαισθησία στο φως και τα έντονα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Απαιτούνται καινοτόμες προσεγγίσεις για εφαρμογές που περιλαμβάνουν ΑΕ και η νανοενθυλάκωση είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους (Luis *et al.*, 2019).

Επίσης, όπως και κάθε θεραπευτικό φάρμακο, τα αιθέρια έλαια μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες ή τοξικές παρενέργειες. Αρκετές μελέτες θέτουν βιοχημικές, αιματολογικές και ιστοπαθολογικές παραμέτρους για την αξιολόγηση των συγκεντρώσεων τοξικότητας στα έλαια που έχουν δοκιμαστεί (Hashimoto *et al.*, 2016, Soares *et al.*, 2016, Soares *et al.*, 2017a, b). Συγκεκριμένα σε ψάρια, οι πιο ευνοϊκές συγκεντρώσεις που ελήφθησαν από *in vitro* δοκιμές εφαρμόστηκαν μέσω θεραπευτικών λουτρών, λόγω αυξημένης τοξικότητας με χρήση άλλων μεθόδων (Malheiros *et al.*, 2016, Hashimoto *et al.*, 2016, Valladão *et al.*,

2016, Soares *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2017a, b). Οι Soares *et al.*, (2017 a,b) μέσω λουτρών εξέθεσαν ψάρια του είδους *C.macropomum* σε θεραπείες με νερό και αλκοόλ, και σε συγκεντρώσεις 10 και 20 mg/L του αιθέριου ελαίου του *L.sidooides* για αποπαρασίτωση, προκάλεσαν σοβαρές αλλοιώσεις στα βράγχια, όπως υπερπλασία και σύντηξη του ελασματοειδούς επιθηλίου των βραγχίων, αγγειοδιαστολή, αποκόλληση του ελασματοειδούς επιθηλίου και ανεύρυσμα ελασματοειδούς, διάσπαση του επιθηλίου με αιμορραγία, οίδημα και νέκρωση. Υπάρχει πάντα ανάγκη να γνωρίζουμε τις υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις κάθε αιθέριου ελαίου για όλα τα είδη που προσπαθούμε να θεραπεύσουμε (Tavares-Dias, 2018).

1.7.7 Νανογαλακτώματα

Τα αιθέρια έλαια έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, γεγονός που υπονομεύει τη χρήση τους ως δραστικές ουσίες. Ως εκ τούτου πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία ώστε να δημιουργηθεί σκεύασμα αποτελεσματικό για χρήση σε έρευνα. Μια τεχνολογία που έχει προσελκύσει ευρύ ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για χρήση στην υδατοκαλλιέργεια είναι η νανοτεχνολογία (Luis *et al.*, 2019). Η νανοτεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί για την επίλυση προβλημάτων υδατοδιαλυτότητας και σταθερότητας των δραστικών ουσιών. Υπάρχουν αρκετοί νανοφορείς φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων, των λιποσωμάτων και των νανογαλακτωμάτων. Τα νανογαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως νανοφορείς φαρμάκων και αιθέριων ελαίων. Η πλειονότητα τους είναι διασπορές νανομετρικών σταγονιδίων ελαίου στο νερό που σταθεροποιούνται από επιφανειοδραστικές ουσίες. Το μέγεθος σταγονιδίων ενός νανογαλακτώματος συνήθως κυμαίνεται από 20 έως 200 nm (Jaiswal *et al.*, 2015). Μερικά βασικά πλεονεκτήματα αυτών των νανοφορέων είναι η εύκολη προετοιμασία, η απλή σύνθεση, η δυνατότητα παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα, το χαμηλό κόστος παραγωγής και η υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα.

1.8 Μελέτες με αιθέρια έλαια σε σαλιγκάρια

Οι **Linhart & Thompson** (1995) παρατήρησαν ότι σε φυσικούς πληθυσμούς θυμαριού στη νότια Γαλλία εντοπίζονται έξι γενετικά διαφορετικές χημικές ουσίες, «χημειότυποι», καθένας από τους οποίους διαφοροποιείται από ένα μόνο κυρίαρχο μονοτερπένιο που δίνει στα μεμονωμένα φυτά χαρακτηριστική μυρωδιά και γεύση. Οι μεμονωμένοι πληθυσμοί μπορούν να περιέχουν και τους έξι χημειότυπους, αλλά συχνά κυριαρχούνται από έναν έως τρεις χημειότυπους. Έλεγχξαν αν σαλιγκάρια του είδους *Cornu aspersum*, τα οποία τρέφονται με θυμάρι στη φύση, είναι επιλεκτικά φυτοφάγα και αν η επιλεκτικότητά τους σχετίζεται με το χημικό πολυμορφισμό του αιθέριου ελαίου του θυμαριού. Οι προτιμήσεις ανήλικων και ενήλικων σαλιγκαριών ελέγχθηκαν με τη χορήγηση τροφής σε μεμονωμένα ζώα με επιλογή έξι χημειοτύπων, σε τρεις πειραματικές δοκιμές: με ολόκληρα φυτά, θρεπτικές πάστες που περιείχαν θρυμματισμένα φύλλα θυμαριού και θρεπτικές πηκτές που περιείχαν ένα απεσταγμένο μονοτερπένιο ως πρόσθετο. Παρατηρήθηκαν σημαντικά και επαναλαμβανόμενα πρότυπα προτίμησης.

Ενήλικα και ανώριμα σαλιγκάρια προτίμησαν περισσότερο το χημειότυπο της λιναλόλης και λιγότερο της καρβακρόλης και θυμόλης. Αυτή η προτίμηση ήταν πιο έντονη όταν προσφέρθηκαν στα σαλιγκάρια πηκτές με μονοτερπένιο σε σχέση με ολόκληρα φυτά ή κομμάτια τους. Επιπλέον τα σαλιγκάρια που σιτίστηκαν αποκλειστικά με τροφή που περιείχε λιναλόλη κέρδισαν βάρος ενώ όσα σιτίστηκαν με τροφή που περιείχε καρβακρόλη έχασαν βάρος. Όλα τα σαλιγκάρια έδειξαν σημαντική προτίμηση για τη λιναλόλη. Επομένως ενήλικα και ανήλικα σαλιγκάρια προτίμησαν τροφές με βάση την παρουσία συγκεκριμένων μονοτερπενίων, πρόκειται για φυσική συμπεριφορά των ζώων η οποία δεν προκύπτει από οποιαδήποτε εκπαίδευσή τους, τα φαινορικά μονοτερπένια όπως η καρβακρόλη είναι αποθηκευτικά για τα σαλιγκάρια.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η μελέτη των **Araújo et al.** (2019) που είχε στόχο την αναγνώριση της χημική σύνθεσης του αιθέριου ελαίου από φύλλα *X.ochrantha* και την αξιολόγηση της επίδρασης του νανογαλακτώματος που παράγεται με αυτό το έλαιο στα αναπτυξιακά στάδια αυγών και στη θνησιμότητα διαφορετικών ειδών του γένους *Biomphalaria*, που αποτελεί μοναδική μελέτη με χρήση νανογαλακτώματος αιθερίων ελαίων σε σαλιγκάρια.

Τα αποτελέσματα της έρευνας επιβεβαιώνουν ότι το νανογαλάκτωμα του αιθέριου

ελαίου που προέρχεται από φύλα του είδους *X.ochrantha* είναι αποτελεσματική εναλλακτική λύση για τον έλεγχο των πληθυσμών μαλακίων που εμπλέκονται στον κύκλο μολυσματικών ασθενειών και συγκεκριμένα στο γένος *Biomphalaria* που αποτελεί ενδιάμεσο ξενιστή και ευθύνεται για τη μετάδοση σχιστοσομίας στον άνθρωπο.

Τα γαλακτώματα περιείχαν 5% (w/w) έλαιο *X.ochrantha*, 5% (w/w) επιφανειοδραστικές ουσίες και 90% (w/w) νερό. Νανογαλάκτωμα αιθέριου ελαίου από *X.ochrantha* (100 ppm) αραιώθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 80 ppm, 60 ppm και 40 ppm με απεσταγμένο νερό. Για τον προσδιορισμό θνησιμότητας, 10 ενήλικα σαλιγκάρια από κάθε είδος, για κάθε συγκέντρωση αντίστοιχα εκτέθηκαν σε 2 mL του νανογαλακτώματος, κάθε ζώο σε δοχείο για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η θνησιμότητα των σαλιγκαριών καταγράφηκε για τις επόμενες 48 ώρες και συγκρίθηκε με το νανοσκεύασμα μάρτυρα (100 ppm συγκέντρωση), το θετικό μάρτυρα (Niclosamide σε συγκέντρωση 1 ppm) και τον αρνητικό μάρτυρα (απεσταγμένο νερό). Η απουσία συστολής των σαλιγκαριών στα κελύφη τους μετά από διέγερση της κεφαλοποδικής μάζας και απελευθέρωση της αιμολέμφου ήταν τα κριτήρια θανάτου. Για κάθε συγκέντρωση νανογαλακτώματος έγιναν τρεις επαναλήψεις.

Η κοχλιοκτόνος δράση του νανογαλακτώματος που περιέχει το αιθέριο έλαιο του *X.ochrantha* έναντι των λιμναίων γαστεροπόδων του γένους *Biomphalaria* παρατηρήθηκε και στα τρία αξιολογούμενα είδη, *B.tenagophila*, *B.straminea* και *B.glabarata* συμπεριλαμβανομένων ατόμων διαφορετικών ηλικιών και μεγεθών και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης αυγών. Παρατηρήθηκαν διαφορές στη θνησιμότητα στα διαφορετικά είδη, σε συγκέντρωση 47 ppm για 24 ώρες το *B.tenaghofila* φάνηκε να είναι το πιο ευαίσθητο στο νανογαλάκτωμα, ενήλικα άτομα *B.glabrata* εμφάνισαν αντίσταση και ενήλικα άτομα του είδους *B.straminea* παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία. Αποδείχθηκε ότι μικρότερα μεγέθη ατόμων του ίδιου είδους είναι λιγότερο ανθεκτικά στη δράση νανογαλακτώματος αιθέριου ελαίου, υποδηλώνοντας ότι τα πιο ώριμα άτομα μεγαλύτερου μεγέθους μπορεί να έχουν ένα πιο ανεπτυγμένο σύστημα αντίστασης έναντι των ενεργών συστατικών του νανογαλακτώματος. Το νανογαλάκτωμα είχε ανασταλτική δράση στην ωοτοκία σε συγκεντρώσεις 47 ppm και 78 ppm. Όλα τα αυγά από πρόσφατη ωοτοκία δύο ημερών παρουσίασαν 100% θνησιμότητα σε 24 ώρες.

Επιπροσθέτως, οι **Yokou et al.** (1998) εξέτασαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρωματικών φυτών που απαντώνται συχνά στο μεσογειακό περιβάλλον και των

σαλιγκαριών που τρέφονται με αυτά. Τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *Origanum vulgare vulgare* και *Origanum vulgare hirtum*. Διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητα και την ποιοτική σύνθεση του αιθέριου ελαίου τους. Το *O.v.hirtum* περιέχει συγκριτικά μεγαλύτερη ποσότητα και είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις.

Μελετήθηκε η επίδρασή τους στη διατροφική συμπεριφορά τριών ειδών σαλιγκαριών, *Helix lucorum*, *Cornu aspersum* και *Eobania vermiculata*. Οι συμπεριφορές των σαλιγκαριών απέναντι σε διαφορετικές πηγές τροφής, ακατέργαστες ή επεξεργασμένες, με ή χωρίς αιθέρια έλαια, αξιολογήθηκε κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων αναζήτησης τροφής. Κατά τη διάρκεια του σταδίου εγκλιματισμού, τα σαλιγκάρια απέρριπταν τροφές πλούσιες σε φαινόλη. Κατά το στάδιο της αποδοχής, όλα τα είδη σαλιγκαριών απέρριψαν τύπους τροφών που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου του *O.v.hirtum*.

Στο στάδιο της σίτισης η συμπερίληψη αιθέριου ελαίου του *O.v.hirtum* προκάλεσε μείωση της ημερήσιας κατανάλωσης τροφής. Το αιθέριο έλαιο του *O.v.vulgare* δεν προκάλεσε καμία αξιοσημείωτη αλλαγή στη συμπεριφορά των σαλιγκαριών. Αντίθετα, αυτό του *O.v.hirtum* είχε αποθητική δράση, ιδιαίτερα όταν υπήρχε φυσικά σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μεταξύ των ειδών σαλιγκαριών το *H.lucorum*, το οποίο δεν μοιράζεται τον ίδιο βιότοπο με το *O.v.hirtum*, ήταν το λιγότερο ανεκτικό στο αιθέριο έλαιό του.

Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας επισκόπησης βιβλιογραφίας με χορήγηση αιθέριων ελαίων σε γαστερόποδα:

Πίνακας 2. Επισκόπηση βιβλιογραφίας χρήσης αιθέριων ελαίων σε γαστερόποδα.

Εργασία	Είδος αρωματικού φυτού	Μεθοδολογία	Είδος γαστερόποδου	Σκοπός εργασίας	Αποτέλεσμα
Linhart et al., 1994	Θυμάρι: <i>T. vulgaris</i> (6 χημειότυποι)	•Ολόκληρο φυτό •Μείγμα με αποξηραμένα φύλλα (1g σκόνη) •Μείγμα με προσθήκη ελαίου (0,1ml)	<i>C.a.aspersum</i>	Επίδραση κάθε τύπου στην επιλογή τροφής	Ο τύπος λιναλοόλη τα καλύτερα αποτελέσματα στην επιλογή τροφής
Vokou et al., 1998	Ρίγανη: <i>O. vulgare hirtum</i> & <i>O. vulgare vulgare</i>	• Υπολείμματα φύλλων μετά την απόσταξη • Φύλλα 2 ειδών ρίγανης • Υπολείμματα φύλλων μετά την απόσταξη με ψέκασμα ελαίου ρίγανης • Pellet με έλαιο διαλυμένο σε ακετόνη • Pellet με έλαιο σε συγκέντρωση 10%	<i>C.a.aspersum</i> <i>Eobania vermiculata</i> <i>Helix lucorum</i>	Επίδραση στην συμπεριφορά τους	Αποφυγή υψηλών συγκεντρώσεων ελαίου. Το είδος <i>O. vulgare vulgare</i> δεν επηρέασε τη συμπεριφορά των σαλιγκαριών
Linhart et al., 1999	Θυμάρι: <i>T. vulgaris</i> (6 χημειότυποι)	•Ολόκληρο φυτό •Μείγμα αποξηραμένων φύλλων με ζελατίνη	<i>Deroceras reticulatum</i>	Επίδραση κάθε τύπου στην επιλογή τροφής	Φυτά: Προτίμηση στους χημειότυπους γερανιόλης (G) και τερπινεόλης (A) Μείγμα (gelatine cake): προτίμηση στη γερανιόλη
Lahlou et al., 2001	28 είδη εντός αυτών το <i>Origanum compactum</i>	24 ώρες σε διάλυμα	<i>Bulinus truncatus</i>	Επίδραση στα σαλιγκάρια για περιορισμό της σχιστοσωμίας	Θανάτωση (0,44 ppm)
Ferreira et al., 2009	Θυμόλη (Θυμάρι)	Αυγά για 10 λεπτά εντός διαλύματος με απεσταγμένο νερό Ανήλικα σε 5 ml διαλύματος	<i>Subulina octona</i>	Επίδραση σε ανάπτυξη, αναπαραγωγή και επιβίωση	Αυγά 2,5% εκκόλαψη Ανήλικα 75% και 45% επιβίωση Συγκέντρωση (2,5 g/L, 5 g/L)
Ferreira et al., 2011	Θυμόλη (Θυμάρι)	Ανήλικα σε 5 ml διαλύματος	<i>Bradybaena similis</i>	Επίδραση σε ανάπτυξη, αναπαραγωγή και επιβίωση	Αυγά 20% εκκόλαψη Ανήλικα 10% και 0% επιβίωση Συγκέντρωση (2,5 g/L, 5 g/L)
Mc Donnell et al., 2016	11 είδη ελαίων	24 ώρες σε τριβλίο Petri με φίλτρο εμποτισμένο στο έλαιο (1% v/v)	<i>C.a.aspersum</i>	Καταπολέμηση σαλιγκαριών	(LC50%, v/v) Cinnamon 0.157 Clove bud 0.027 Garlic 0.115 Lemongrass 0.160 Peppermint 0.140 Pine 0.082 Spearment 0.103
Klein et al., 2019	13 είδη ελαίων (Birch Tar, Bitter Orange, Cedarwood, Cinnamon, Clove Bud, Eucalyptus, Garlic, Lemongrass, Peppermint, Pine (white), Rosemary, Spearment, Thyme)	24 ώρες σε τριβλίο Petri με φίλτρο εμποτισμένο στο έλαιο (1% v/v)	<i>Deroceras reticulatum</i>	Ιδανική συγκέντρωση ελαίου για την καταπολέμηση	(LC50%, v/v) Thyme 0.148 Spearment 0.153 Pine (white) 0.176 Peppermint 0.199 Garlic 0.204 Rosemary 0.307 Lemongrass 0.320 Cinnamon Cassia 0.420

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όσον αφορά στα σαλιγκάρια, η πλειονότητα των μελετών επικεντρώνεται στο πώς τα φυτοφάρμακα μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ευζωία των σαλιγκαριών, καθώς αντιμετωπίζονται συχνά ως γεωργικά παράσιτα. Η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων εντομοκτόνων και τοξικών ουσιών, μέσω δολωμάτων, με τοπική εφαρμογή κ.λ.π. συνήθως εμφανίζει γρήγορα αρνητικές επιπτώσεις στον ιστό του πεπτικού αδένου, με το πιο σοβαρό αποτέλεσμα να είναι η εμφάνιση νέκρωσης. Τα αιθέρια έλαια είναι γνωστό ότι έχουν κοχλιοκτόνες ιδιότητες και ως εκ τούτου υπάρχουν ελάχιστες μελέτες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό τη συμπερίληψή τους σε σιτηρέσια που προορίζονται για σαλιγκάρια, με τους Linhart *et al.* (1995) να καταγράφουν αύξηση βάρους των σαλιγκαριών με συμπερίληψη αιθέριου ελαίου στη διατροφή τους.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ώστε να τεκμηριωθεί αν ο εμπλουτισμός των σιτηρεσίων των σαλιγκαριών με νανογαλάκτωμα αιθέριων ελαίων μπορεί να ενισχύσει την ποιότητα των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών και τη διαβίωσή τους σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, να διερευνηθεί η επίδραση των αιθέριων ελαίων στον πεπτικό αδένου - ο οποίος αξιολογείται ως δείκτης ευζωίας των σαλιγκαριών - και να καθοριστεί ανώτατο επίπεδο χορήγησης αυτών μέσω διατροφής στο εμπορικά επιτυχημένο είδος *Cornu aspersum maximum*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικές τροφές με χρήση νανογαλακτώματος αιθέριων ελαίων

Πραγματοποιήθηκε διατροφικό πείραμα με την προσθήκη νανογαλακτώματος αιθέριων ελαίων (ρίγανης, λεβάντας, γαρύφαλλου, δεντρολίβανου και αρτεμίσιας) στο σιτηρέσιο του κοινού εκτρεφόμενου είδους χερσαίου γαστεροπόδου *Cornu aspersum maximum*.

Οι πειραματικές σαλιγκαροτροφές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέσσερις: Μία τροφή μάρτυρας (Μ) η οποία δεν περιέχει νανογαλάκτωμα αιθέριων ελαίων και χρησιμοποιείται στις εκτροφές σαλιγκαριών (ορνιθοτροφή 1ης ηλικίας), και άλλες τρεις στις οποίες το νανογαλάκτωμα είχε ενσωματωθεί σε συγκεντρώσεις 1ml/Kg τροφής (τροφή Σ1), 3ml/Kg τροφής (τροφή Σ3) και 5ml/Kg τροφής (τροφή Σ5).

Τα επίπεδα χορήγησης του νανογαλακτώματος στις σαλιγκαροτροφές βασίστηκαν στην εμπειρική δοσολογία που χρησιμοποιείται επί της παρούσης σε άλλες εκτροφές και ταυτόχρονα λαμβάνοντας υπόψη τις δοσολογίες αιθέριων ελαίων σε σχετικές δημοσιευμένες εργασίες της διεθνούς βιβλιογραφίας. Η τροφή μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε για το διατροφικό πείραμα της εκτροφής σαλιγκαριών είναι εμπορική ορνιθοτροφή πρώτης ηλικίας καλά αλεσμένη, αναμεμιγμένη με 30% ανθρακικό ασβέστιο.

Η σύσταση της εμπορικής ορνιθοτροφής ήταν: καλαμπόκι, σογιάλευρο, πίτουρο σίτου, υποκατάστατο γάλακτος σε σκόνη, κτηνοτροφική μαγιά, ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), φωσφορικό μονοασβέστιο, σογιέλαιο, αλάτι, μεθειονίνη, πρωτεΐνη σόγιας, πρόμιγμα βιταμινών και ιχνοστοιχείων, οξινιστής.

Η ενσωμάτωση του νανογαλακτώματος σε κάθε μία από τις πειραματικές τροφές έγινε μέσω προσεκτικού ψεκασμού αντίστοιχης συγκέντρωσης στην τροφή μάρτυρα, όπου το νανογαλάκτωμα αφέθηκε να απορροφηθεί εντός απαγωγού μέσω διοχέτευσης αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα.

2.2 Προετοιμασία χώρου εκτροφής

Για την υλοποίηση του διατροφικού πειράματος χρησιμοποιήθηκαν υγιή σαλιγκάρια του είδους *Cornu aspersum maximum* τα οποία προήλθαν από εμπορική εκτροφή εγκατεστημένη στο νομό Μαγνησίας. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 2000 σαλιγκάρια και τοποθετήθηκαν στις ειδικές εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα σαλιγκάρια παρέμειναν σε συνθήκες εγκλιματισμού για 7-10 ημέρες πριν την έναρξη της σίτισης τους με τις πειραματικές τροφές, ενώ κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού σιτίστηκαν με τροφή του εμπορίου κατάλληλη για το είδος και το στάδιο ανάπτυξης τους.

Το υλικό κατασκευής του σκελετού του διχτυοκηπίου είναι γαλβανισμένο μέταλλο, ενώ καλύπτεται με δίχτυ πολυαιθυλενίου σκίασης 80%. Το δίχτυ συμβάλλει στη ρύθμιση των συνθηκών θερμοκρασίας – υγρασίας, ενώ προστατεύει και το ζωικό κεφάλαιο από εχθρούς. Ακόμα, περιμετρικά, υπάρχει κάλυψη με λαμαρίνα που αποτρέπει την είσοδο τρωκτικών και ερπετών. Η διατήρηση της απαιτούμενης υγρασίας επιτυγχάνεται με σύστημα υδρονέφωσης χαμηλής πίεσης. Η λειτουργία του συστήματος δροσισμού ρυθμίστηκε και λειτουργούσε καθημερινά στις 19:00 με διάρκεια 30 λεπτά. Τις ημέρες με βροχή, το σύστημα δροσισμού δεν λειτουργούσε. Για τον έλεγχο και την καταγραφή των κλιματικών συνθηκών στο διχτυοκήπιο τοποθετήθηκαν στο χώρο εκτροφής των σαλιγκαριών φορητοί αισθητήρες θερμοκρασίας και υγρασίας του αέρα. Τα σαλιγκάρια χωρίστηκαν σε 500 ανά πειραματική σειρά αφού πρώτα μαρκαρίστηκαν. Σιτίζονταν ανά 2 ημέρες και σε κάθε τάισμα η τροφή ζυγιζόταν ώστε να αντιστοιχούν 2 kg ανά πειραματική σειρά.

2.3 Δειγματοληψίες

Η διάρκεια του πειράματος ήταν δύο μήνες (Σεπτέμβριος – Οκτώβριος). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν εβδομαδιαίως, πρωινή ώρα πριν ταΐσουν τα ζώα. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέγονταν 30 μαρκαρισμένα σαλιγκάρια από τρεις διαφορετικές θέσεις τυχαία επιλεγμένες ανά πειραματική σειρά, σε σύνολο 90 ανά πειραματική σειρά.

Σε αυτά πραγματοποιήθηκε ατομική ζύγιση νωπού βάρους (gr) και γινόταν μέτρηση μεγάλης διαμέτρου του κελύφους (mm), ενώ καταγράφηκε το στάδιο ενηλικίωσης. Σε κάθε μεταχείριση καταγράφονταν τα νεκρά σαλιγκάρια και αφαιρούνταν από το εκτροφείο. Τέλος, τα υπολείμματα της τροφής στην ταΐστρα ζυγίζονταν ανά δύο ημέρες για τον υπολογισμό της κατανάλωσης της τροφής.

Στο τέλος του πειράματος συλλέχθηκαν όλα τα σαλιγκάρια. Τα ζώα αρχικά ζυγίστηκαν ζωντανά και έγινε μέτρηση διαμέτρου. Έπειτα έγινε αναισθητοποίηση και ανατομή.

2.4 Ανατομή – Δείγματα για αναλύσεις

Με την λήξη του διατροφικού πειράματος, συλλέχθηκαν δείγματα σαλιγκαριών και ιστοί τους από κάθε διατροφική ομάδα προκειμένου να πραγματοποιηθούν εργαστηριακές αναλύσεις.

2.5 Ιστολογική ανάλυση πεπτικού αδένος

Η ιστολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 4 σαλιγκάρια *C.a.maximum* από κάθε πειραματική σειρά. Για την ιστολογική μελέτη, η θανάτωση έγινε με γαρυφαλέλαιο και νερό έπειτα από τέσσερις ημέρες ασιτίας, χρησιμοποιώντας 20 σταγόνες *Eugenia caryophyllus* διαλυμένες σε 50 ml νερό (Araujo *et al.*, 1995). Η σπλαχνική και ποδική μάζα κάθε σαλιγκαριού διαχωρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά σε δοχεία με υγρό Davidson. Η περεταίρω επεξεργασία και παρατήρηση των πεπτικών αδένων έγινε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο (Χατζιωάννου & Βαφείδης, 2015, Kougiagka *et al.*, 2022a).

2.5.1 Απομόνωση ιστού

Αρχικά απομονώθηκε τμήμα ιστού από τον πεπτικό αδένα κάθε σαλιγκαριού με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριού και λαβίδας και καταγράφηκαν οι κωδικοί των δειγμάτων.

2.5.2 Μονιμοποίηση

Τα δείγματα μετά τη λήψη και την καταγραφή τους στο εργαστήριο τοποθετήθηκαν σε κασετίνες διαστάσεων 4,5 cm x 2,8 μιας χρήσεως και όλες μαζί οι κασετίνες σε ένα δοχείο με καπάκι, το οποίο περιείχε φορμαλδεΰδη 10%. Η διαδικασία διήρκησε 48 ώρες:

- Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε φορμαλδεΰδη 10% και μεταφέρθηκαν σε ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C, όπου παρέμειναν για 12 ώρες.
- Έγινε αντικατάσταση του διαλύματος μονιμοποίησης με νέο διάλυμα, όπου τα δείγματα παρέμειναν για 12 ακόμα ώρες σε θερμοκρασία 4 °C.

2.5.3 Αφυδάτωση σε Ιστοκινέτα

Οι κασετίνες με τους ιστούς έπειτα τοποθετήθηκαν σε ειδικό εξάρτημα της ιστοκινέτας, το οποίο με τη σειρά του τοποθετήθηκε στην ιστοκινέτα, όπου πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά τα παρακάτω στάδια:

- Αφυδάτωση: Για την απομάκρυνση του νερού που υπάρχει στον ιστό γίνονται διαδοχικές εμβυπτίσεις με αλκοόλες αυξανόμενου βαθμού, ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση του ιστού.
- Καθαρισμός: Η απομάκρυνση της αλκοόλης γίνεται με διαδοχικές πλύσεις με ξυλόλη. Τόσο η αφυδάτωση όσο και ο καθαρισμός πραγματοποιούνται σε συνθήκες δωματίου.

- Εμποτισμός με παραφίνη.

2.5.4 Έγκλειση Ιστών σε Παραφίνη

Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη προς αποφυγή πήξης της υπάρχουσας παραφίνης που έχει παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία του εμποτισμού. Η διαδικασία της έγκλεισης έγινε σε μηχανήμα σκλήνωσης. Ο ιστός τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι, το οποίο γεμίζει με υγρή παραφίνη και μεταφέρεται στην ψυχρή πλάκα όπου στερεοποιείται η παραφίνη. Έπειτα αφαιρέθηκε το καλούπι και απομακρύνθηκε η στερεοποιημένη παραφίνη από τις άκρες του κύβου. Η έγκλειση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60 °C, ενώ τα μπλοκάκια παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να παγώσει η παραφίνη.

2.5.5 Τεχνική κοπής ιστολογικών τομών

Ο κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό, τοποθετήθηκε και στερεώθηκε στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου. Η λεπίδα της μικροτόμου καθώς και ο εργαστηριακός πάγκος, καθαρίστηκαν προσεκτικά με ξυλόλη. Η θέση του υποδοχέα ρυθμίστηκε σε πάχος τομής 7 μm έτσι ώστε το μπλοκ της παραφίνης μόλις να έρχεται σε επαφή με τη λεπίδα. Οι πρώτες τομές απορρίφθηκαν, διότι τα άκρα του ιστού δεν ήταν κατάλληλα. Μόλις άρχισε να σχηματίζεται αλυσίδα από τομές, αυτές απομακρύνθηκαν από το μαχαίρι με ένα λεπτό πινέλο. Οι τομές παραφίνης αφού εκπύχθηκαν σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 40°C, επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η επιπεδοποίηση των τομών έγινε με την τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας με τις τομές πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα ώστε να εξατμιστεί όλο το νερό.

2.5.6 Αποπαραφίνωση, χρώση και επικάλυψη

Η μεταφορά των αντικειμενοφόρων έγινε με ειδικό δοχείο με ειδικούς υποδοχείς. Το πρωτόκολλο χρώσης που τηρήθηκε είναι το παρακάτω:

Πίνακας 3. Στάδια που αντιστοιχούν σε πρωτόκολλο χρώσης H&E με χρόνους διάρκειας στα αντίστοιχα διαλύματα. (Χατζηιωάννου & Βαφειδής, 2015)

α/α	Διαλυμα	Διάρκεια σταδίου	Στάδιο
1	Ξυλόλη	2 min	Αποπαραφίνωση
2	Ξυλόλη	2 min	
3	Αιθανόλη 100 %	2 min	Απομάκρυνση Ξυλόλης
4	Αιθανόλη 100 %	2 min	
5	Αιθανόλη 95 %	1 min	Ενυδάτωση
6	Αιθανόλη 95 %	1 min	
7	Νερό βρύσης	15 min	
8	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5 έως 15 min	Χρώση
9	Διαφοροποίηση	3 έως 5 min	
10	Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
11	Αμμωνιούχο νερό	3 έως 5 καταδύσεις	
12	Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
13	Διάλυμα Ηωσίνης	15 sec έως 2 min	Αφυδάτωση
14	Αιθανόλη 95 %	2 min	
15	Αιθανόλη 95 %	2 min	
16	Αιθανόλη 100 %	2 min	
17	Αιθανόλη 100 %	2 min	
18	Ξυλόλη	2 min	Διαύγαση
19	Ξυλόλη	2 min	

Η επικάλυψη των ιστολογικών τομών έγινε με χρήση DPX. Αμέσως μετά τη χρώση, σε κάθε παρασκευάσμα προσκολλήθηκε η καλυπτρίδα. Κατά τη διαδικασία απλώθηκε DPX με γυάλινη ράβδο πάνω στις τομές των ιστών.

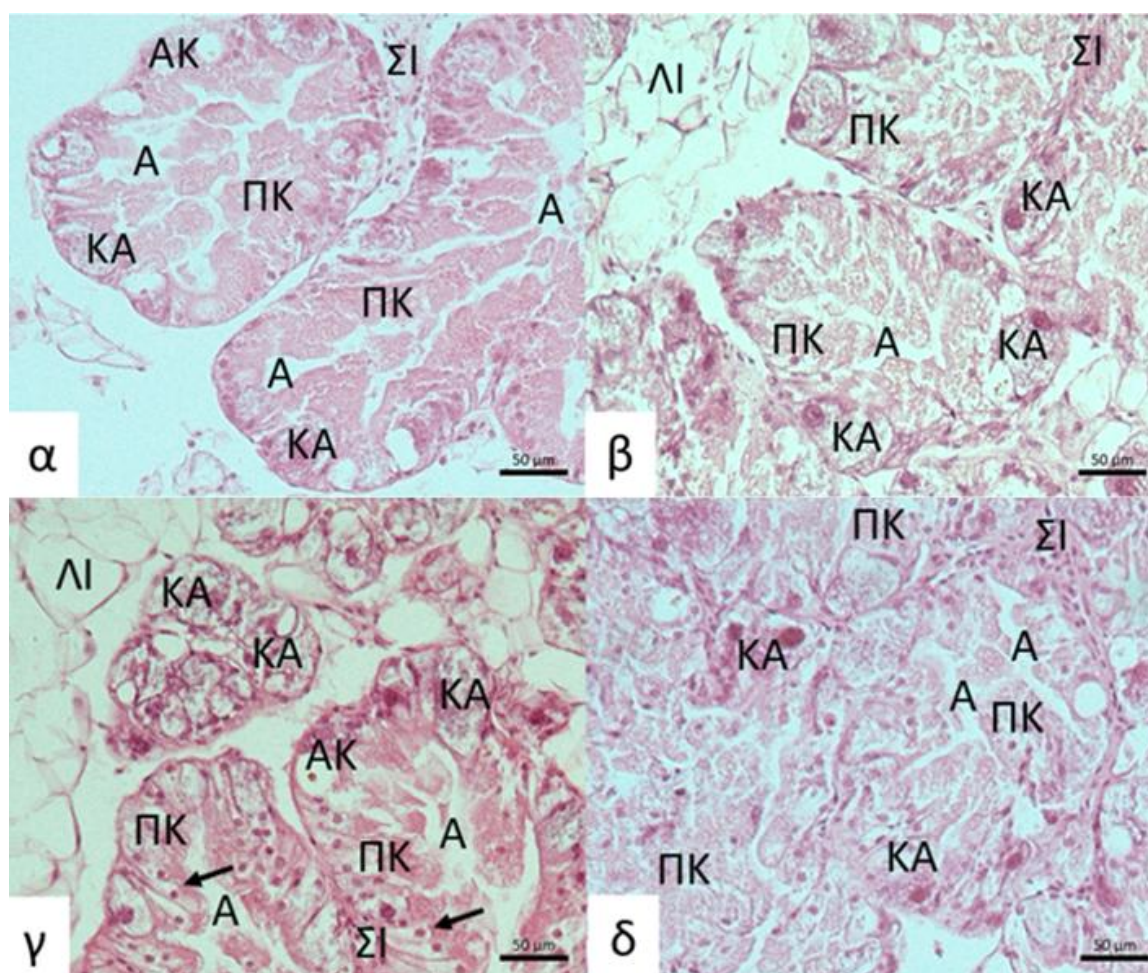
2.5.7 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο

Μετά την επικάλυψη οι τομές του πεπτικού αδένος ήταν ευδιάκριτες και έτοιμες για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο ZEISS Axio scope.A1. Ταυτόχρονα με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, τα δείγματα φωτογραφήθηκαν σε μορφή εικόνων JPG από τη συνδεδεμένη κάμερα ZEISS AxioCam 305 color χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα απεικόνισης ZEN light.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μάρτυρας

Οι μικροφωτογραφίες του πεπτικού αδένος των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τη δίαιτα Μ (μάρτυρας – ορνιθοτροφική 1^{ης} ηλικίας) παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



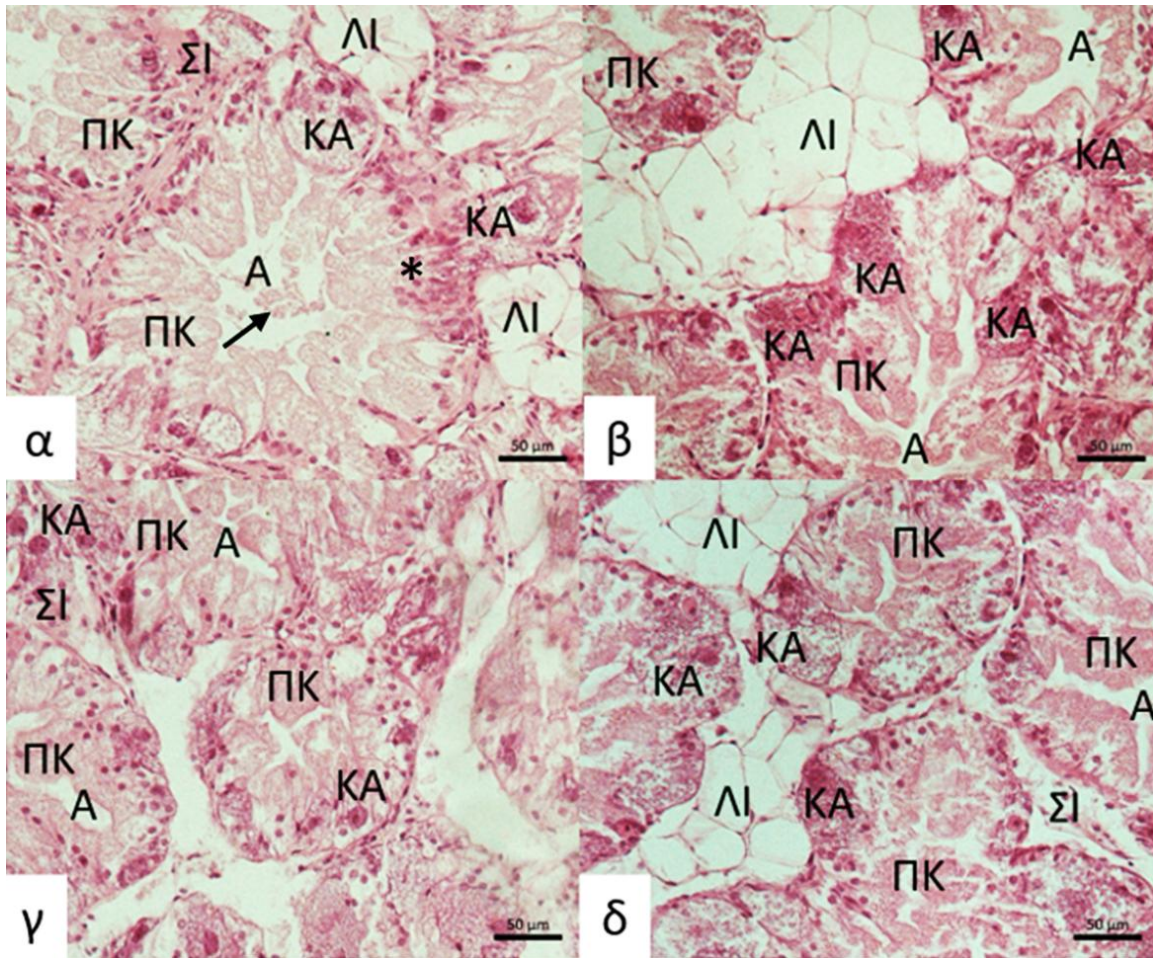
Εικόνα 2. Μικροφωτογραφίες κάθετων ιστολογικών τομών πεπτικού αδένος *C.a.maximum* - σιτισμένα με τροφή Μ (μάρτυρα) - έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Συντομογραφίες: Απεκκριτικά κύτταρα (ΑΚ), Ηπατικός αγωγός (Α), Κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ), Λιπώδης ιστός (ΛΙ), Πεπτικά κύτταρα (ΠΚ), Συνδετικός ιστός (ΣΙ). Βέλος: Κυτταρόπλασμα εντός ηπατικού αγωγού. Κλίμακα 50 μm.

Τα πεπτικά κύτταρα (ΠΚ) αποτελούν τον κύριο τύπο κυττάρων του πεπτικού αδένου. Παρουσιάζουν μορφο-λειτουργικές παραλλαγές ανάλογα με την πεπτική δραστηριότητα του σαλιγκαριού. Στη μικροφωτογραφία 2γ φαίνεται πως λόγω της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας των πεπτικών κυττάρων, «φαγοσώματα» έχουν αποκολληθεί εντός του ηπατικού αγωγού (Α) με μικρές ποσότητες κυτταροπλάσματος από τον κορυφαίο πόλο των πεπτικών κυττάρων.

Πεπτικά κύτταρα με μεγάλα κενοτόπια τα οποία χαρακτηρίζονται ως απεκκριτικά κύτταρα (ΑΚ) εμφανίζονται στα τελικά στάδια της πέψης στις μικροφωτογραφίες 2α και 2γ. Μπορούν να παρατηρηθούν και κενοτόπια χωρίς άπεπτο υλικό στις 2α και 2δ. Σε όλες τις μικροφωτογραφίες παρατηρούνται κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ), τα οποία περιέχουν μικρά σφαιρίδια ασβεστίου. Τα πεπτικά λόβια επενδύονται από συνδετικό ιστό (ΣΙ) στις 2α και 2δ και περιβάλλονται με λιπώδη (ΛΙ) ως επί το πλείστον στις 2β και 2γ.

3.2 Σ1

Οι μικροφωτογραφίες του πεπτικού αδένου των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τη δίαιτα Σ1 (μάρτυρας με προσθήκη 1% νανογαλακτώματος) παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.

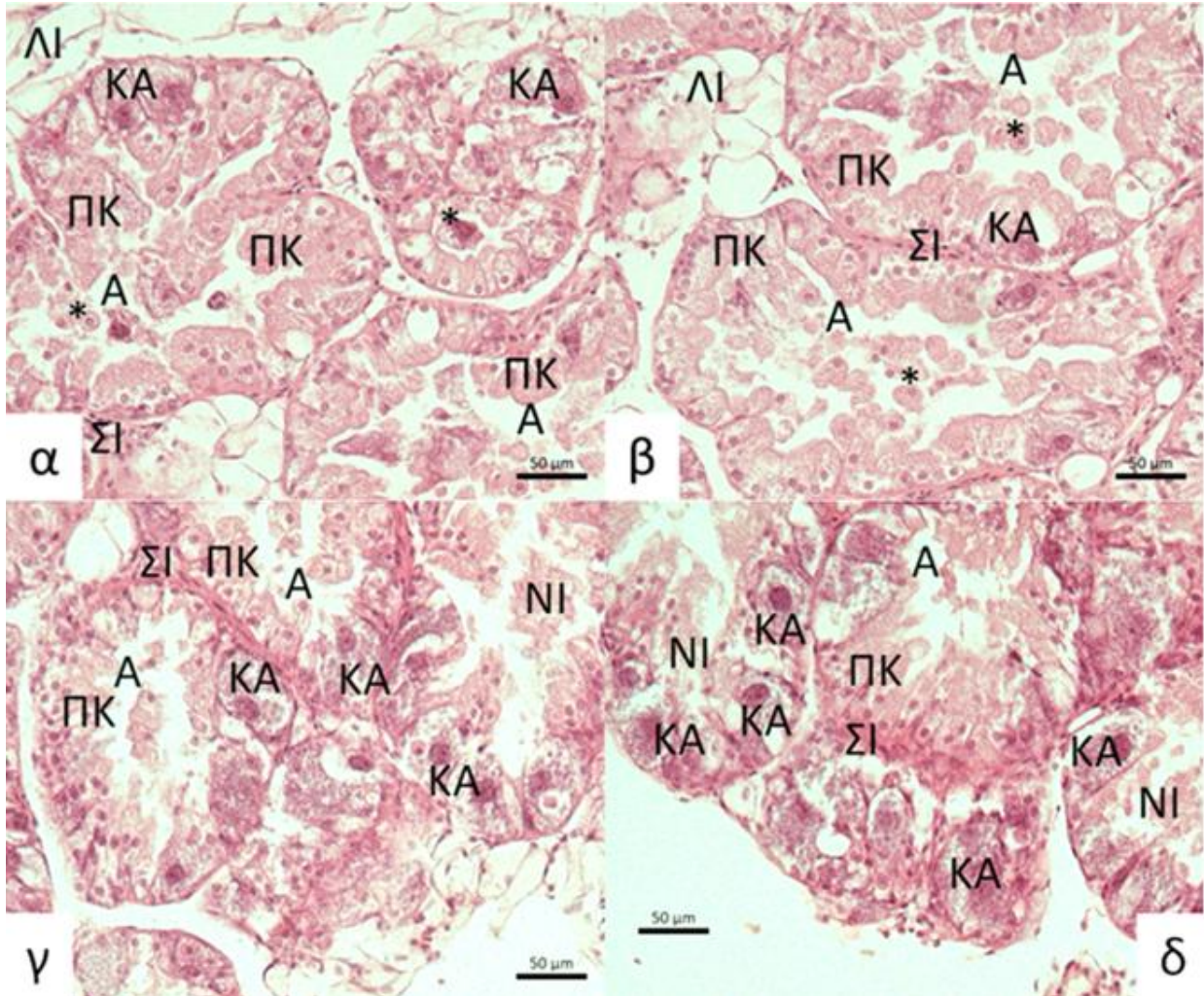


Εικόνα 3. Μικροφωτογραφίες κάθετων ιστολογικών τομών πεπτικού αδένος *C.a.maximum* - σιτισμένα με τροφή ΣΙ - έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Συντομογραφίες: Απεκκριτικά κύτταρα (ΑΚ), Ηπατικός αγωγός (Α), Κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ), Λιπώδης ιστός (ΛΙ), Πεπτικά κύτταρα (ΠΚ), Συνδετικός ιστός (ΣΙ). Αστερίσκος: Πολυπύρρηνα πεπτικά κύτταρα, Βέλος: Κυτταρόπλασμα εντός ηπατικού αγωγού. Κλίμακα 50 μm.

Ως αποτέλεσμα της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας των πεπτικών κυττάρων (ΠΚ), στην εικόνα 3α υπάρχει ποσότητα κυτταροπλάσματος (βέλος) εντός του ηπατικού αγωγού (Α) ο οποίος εμφανίζεται διεσταλμένος. Παρατηρούνται επίσης πολυπύρρηνα (αστερίσκος) πεπτικά κύτταρα. Κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ) υπάρχουν σε όλες τις μικροφωτογραφίες, ιδιαίτερα στις 3β και 3δ παρατηρείται αφθονία σφαιριδίων ασβεστίου εντός των κυττάρων ασβεστίου, το κάθε σφαιρίδιο περιβαλλόμενο από μεμβράνη.

3.3 Σ3

Οι μικροφωτογραφίες του πεπτικού αδένος των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τη δίαιτα Σ3 (μάρτυρας με προσθήκη 3% νανογαλακτώματος) παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.



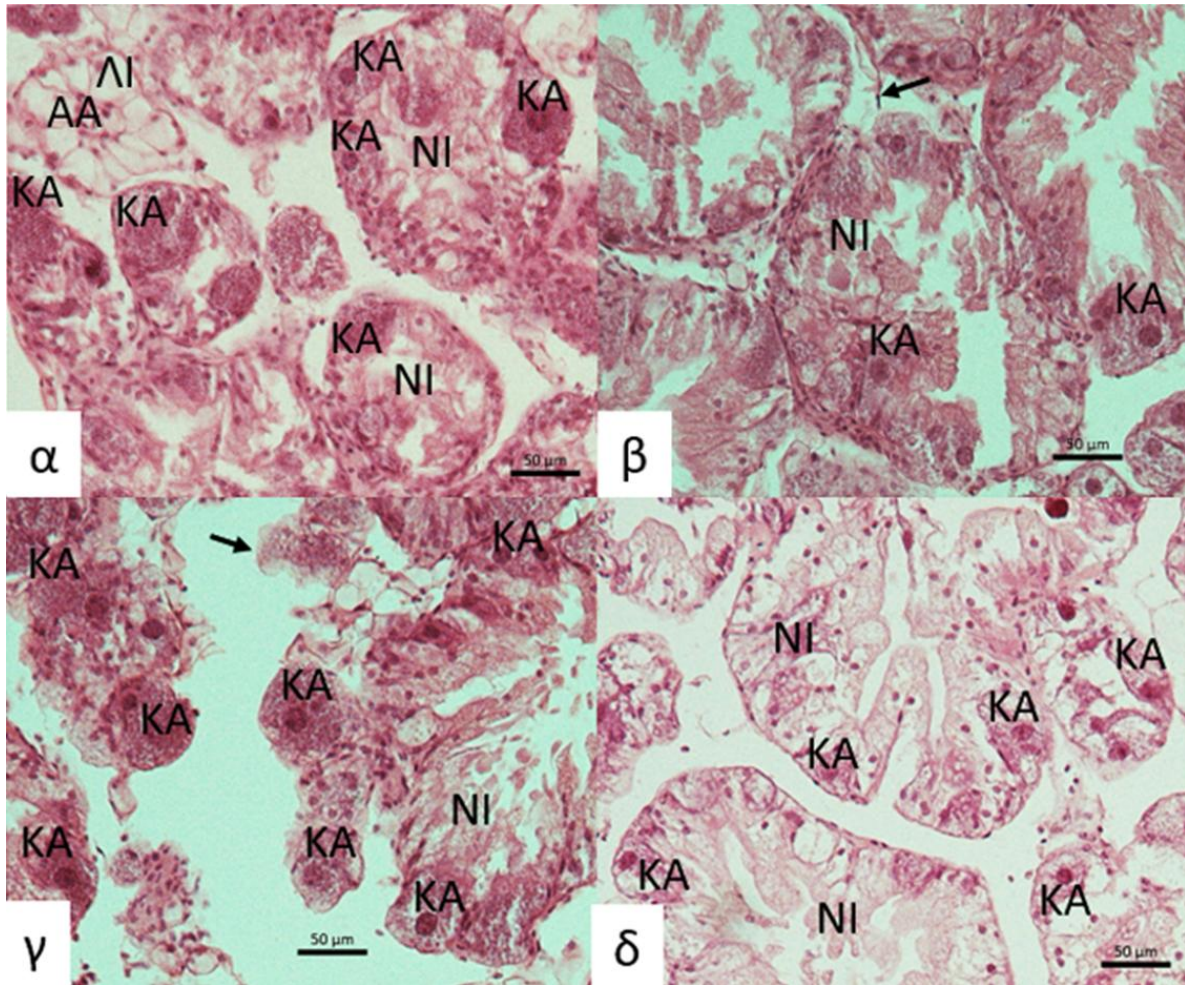
Εικόνα 4. Μικροφωτογραφίες κάθετων ιστολογικών τομών πεπτικού αδένος *C.a.maximum* - σιτισμένα με τροφή Σ3 - έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Συντομογραφίες: Απεκκριτικά κύτταρα (ΑΚ), Ηπατικός αγωγός (Α), Κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ), Λιπώδης ιστός (ΛΙ), Νεκρωτικός ιστός (ΝΙ), Πεπτικά κύτταρα (ΠΚ), Συνδετικός Ιστός (ΣΙ). Αστερίσκος: Αποπτωτικά σώματα. Κλίμακα 50 μm.

Σε όλες τις μικροφωτογραφίες παρατηρείται απόπτωση των πεπτικών κυττάρων (ΠΚ). Στις 4α και 4β τα πεπτικά κύτταρα εξωθούν γειτονικά κύτταρα εντός του ηπατικού αγωγού (Α) σε κάθε λόβιο, χαρακτηριστική είναι η παρουσία αποπτωτικών σωμάτων (αστερίσκος) εντός του ηπατικού αγωγού. Προκύπτει αναδιάταξη των υπόλοιπων πεπτικών κυττάρων και δημιουργία νέων.

Παρατηρούνται μη διογκωμένα κύτταρα λιπώδους ιστού (ΛΙ). Σε όλες τις μικροφωτογραφίες, κάθε λόβιο περιβάλλεται από συνδετικό ιστό (ΣΙ) και τα κύτταρα ασβεστίου (ΚΑ) που υπάρχουν δεν περιέχουν καλοσχηματισμένα σφαιρίδια. Στις μικροφωτογραφίες 4γ και 4δ εμφανίζεται απόπτωση και νέκρωση σε ορισμένα λόβια.

3.4 Σ5

Οι μικροφωτογραφίες του πεπτικού αδένα των σαλιγκαριών που διατράφηκαν με τη δίαιτα Σ5 (μάρτυρας με προσθήκη 5% νανογαλακτώματος) παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Μικροφωτογραφίες κάθετων ιστολογικών τομών πεπτικού αδένος *C.a.maximum* - σιτισμένα με τροφή Σ5 - έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Συντομογραφίες: Αιμολαιμφοαγωγός (ΑΑ), Ηπατικός αγωγός (Α), Κύτταρα οστεοκλάστ (ΚΑ), Λιπώδης ιστός (ΛΙ), Νεκρωτικός Ιστός (ΝΙ), Πεπτικά κύτταρα (ΠΚ). Βέλος: Διακεκομμένη επένδυση. Κλίμακα 50 μm.

Σε όλες τις μικροφωτογραφίες παρατηρείται νέκρωση των πεπτικών κυττάρων (ΠΚ) και ορισμένων κυττάρων οστεοκλάστ. Τα όρια των ηπατικών αγωγών και των πεπτικών κυττάρων δεν είναι διακριτά. Επιπλέον, τα κύτταρα οστεοκλάστ (ΚΑ) είναι γεμάτα με πολύ μεγάλο αριθμό σφαιριδίων. Παρατηρείται σημαντική μείωση του πάχους της επένδυσης των πεπτικών λόβων και σε ορισμένες περιοχές που σημαίνονται με βέλη στις φωτογραφίες 5β και 5γ, η επένδυση των λόβων διακόπτεται και χάνουν τη δομική ακεραιότητά τους.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ώστε να τεκμηριωθεί αν ο εμπλουτισμός των σιτηρεσίων των σαλιγκαριών με νανογαλάκτωμα αιθέριων ελαίων μπορεί να ενισχύσει την ποιότητα των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών και τη διαβίωσή τους σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, να διερευνηθεί η επίδραση των αιθέριων ελαίων στον πεπτικό αδένα - ο οποίος αξιολογείται ως δείκτης ευζωίας των σαλιγκαριών - και να καθοριστεί ανώτατο επίπεδο χορήγησης αυτών μέσω διατροφής στο εμπορικά επιτυχημένο είδος *Cornu aspersum maximum*. Μελετήσαμε την επίδραση νανογαλακτώματος, μείγματος 5 αιθέριων ελαίων (ρίγανης, λεβάντας, γαρύφαλλου, δεντρολίβανου και αρτεμίσιας) στην αποδεκτικότητα της τροφής και στην πάχυνση των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών του είδους *Cornu aspersum maximum*. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν τρία ποσοστά συμπερίληψης του νανογαλακτώματος (1%, 3% και 5%) στο σιτηρέσιο μάρτυρα προκειμένου να προσδιοριστούν τα ανώτερα επιθυμητά επίπεδα που δεν μειώνουν την παραγωγική απόδοση, όπως επίσης εξετάστηκε η ιστομορφολογία του πεπτικού αδένα των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, για να ελεγχθεί η επίδραση των εμπλουτισμένων σιτηρεσίων στην υγεία - ευζωία των σαλιγκαριών.

Τα πεπτικά κύτταρα αποτελούν τον κύριο τύπο κυττάρων του πεπτικού αδένα. Παρουσιάζουν μορφο-λειτουργικές παραλλαγές ανάλογα με την πεπτική δραστηριότητα του σαλιγκαριού: απορρόφηση θρεπτικών ουσιών και πέψη (Zaitsev *et al.*, 2020, Dennis *et al.*, 2021). Η ιδιαίτερη μορφολογία που απεικονίζεται στη μικροφωτογραφία γ του πεπτικού αδένα σαλιγκαριών που διατράφηκαν με το **μάρτυρα**, οφείλεται στην ενδοκυτταρική πεπτική δραστηριότητα κατά την οποία φαγοσώματα και κυτταροπλασματικό υλικό συσσωρεύονται και στη συνέχεια αποσπώνται και χύνονται στον ηπατικό αγωγό από τον κορυφαίο πόλο των πεπτικών κυττάρων και έχει περιγραφεί από τους Dimitriadis *et al.*, (1992) στο είδος *Helix lucorum*. Μπορούν να παρατηρηθούν κενोटόπια με και χωρίς κόκκους. Κύτταρα με μεγάλα κενोटόπια εμφανίζονται στα τελικά στάδια της πέψης, αυτά αντιστοιχούν στα απεκκριτικά κύτταρα που αναφέρονται σε ορισμένα είδη, αλλά φαίνεται να είναι φάση της απεκκριτικής δραστηριότητας των πεπτικών κυττάρων παρά ένας ξεχωριστός τύπος κυττάρου (Lobo-da-Cunha *et al.*, 2019,

Zaitsev *et al.*, 2020). Παρατηρούνται επίσης κύτταρα ασβεστίου, λίγα σε αριθμό και περιέχουν σφαιρίδια ασβεστίου (Fournié & Monique, 1984, Delakorda *et al.*, 2008). Τα πεπτικά λόβια περιβάλλονται κυρίως από συνδετικό ιστό (Zaitsev *et al.*, 2020). Μορφολογικά, οι αυλοί των λόβιων είναι παρόμοιοι με αυτούς που απεικονίζονται σε μελέτη μορφολογίας του πεπτικού αδένου σαλιγκαριών *Helix aspersa* η οποία έγινε από τους Danilova *et al.*, (2022).

Ο εμπλουτισμός της τροφής σαλιγκαριών με νανογαλάκτωμα μείγματος αιθέριων ελαίων σε ποσοστό **1%** συμπερίληψης δεν έδωσε αξιοσημείωτα αποτελέσματα σε σύγκριση με τη δίαιτα M. Έπειτα από εξήντα ημέρες σίτισης με την πειραματική τροφή **Σ1**, τα κύτταρα ασβεστίου φαίνεται σε κάποια λόβια να περιέχουν αφθονία εύκολα ορατών και καλοσχηματισμένων σφαιριδίων – με κάθε σφαιρίδιο να περιβάλλεται από μεμβράνη – και σε άλλα να μην περιέχουν καθόλου. Αυτό αιτιολογείται από τους Delakorda *et al.*, (2008) οι οποίοι χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική μικροσκοπία μελέτησαν τα σφαιρίδια ασβεστίου στα κύτταρα του πεπτικού αδένου του είδους *Chilostoma lefeburiana* λίγο πριν από τη χειμέρια νάρκη, στη μέση και στο τέλος της. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα σφαιρίδια είναι αποκλειστικά ενδοκυτταρικές δομές που περιβάλλονται το καθένα από μεμβράνη και ότι η δομή και η χημική τους σύσταση αλλάζουν ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τον κύκλο ζωής των σαλιγκαριών. Επίσης, τα σφαιρίδια ασβεστίου φαίνεται ότι αποτελούν μέρος ενός πολύπλοκου μηχανισμού ενδοκυτταρικής αποτοξίνωσης (Dennis *et al.*, 2021). Οι αυλοί των πεπτικών λόβιων εμφανίζονται ελαφρώς διευρυμένοι, όπως στη μελέτη που έγινε από τους Ziegler *et al.*, (2021) σχετικά με τις επιδράσεις αντικαταθλιπτικών στο υδρόβιο είδος *Planorbarius corneus*.

Στα πεπτικά λόβια των σαλιγκαριών που σιτίστηκαν με τη δίαιτα **Σ3** η οποία περιείχε **3%** μείγμα αιθέριων ελαίων, προκλήθηκε απόπτωση στα πεπτικά κύτταρα και υπήρξε σημαντική μείωση των κυττάρων ασβεστίου και της περιεκτικότητάς τους σε σφαιρίδια. Αντίστοιχα και οι Bobori *et al.*, (2020) διαπίστωσαν ότι εκθέτοντας σαλιγκάρια του είδους *Cornu aspersum* σε νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου προκλήθηκε απόπτωση. Φαίνεται να υπάρχουν πολύ λίγα κύτταρα ασβεστίου, τα οποία δεν περιέχουν καλοσχηματισμένα σφαιρίδια. Οι Hamed *et al.*, (2007) επίσης παρατήρησαν ότι όταν σε σαλιγκάρια *Eobania vermiculata* δόθηκε methomyl μέσω τοξικών δολωμάτων, μετά από δεκατέσσερις ημέρες σίτισης υπήρξε σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων ασβεστίου και στο μέγεθος των σφαιριδίων που περιείχαν.

Ως απόπτωση χαρακτηρίζεται η απόρριψη των κυττάρων που πεθαίνουν, των οποίων τα γειτονικά κύτταρα τα εξωθούν προς τον αγωγό. Η αναδιάταξη των υπόλοιπων κυττάρων και η δημιουργία νέων γεμίζουν τα κενά που αφήνουν τα νεκρά κύτταρα, διατηρώντας έτσι την ακεραιότητα του επιθηλίου (Phuong *et al.*, 2022). Οι Abdel-Azeem *et al.*, (2023) εξέθεσαν σαλιγκάρια του είδους *Cornu aspersum* σε νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου σε δύο συγκεντρώσεις μέσω ψεκασμού και ανακάλυψαν ότι στη χαμηλότερη συγκέντρωση οι αυλοί διευρύνθηκαν και παρατηρήθηκαν προεξοχές της κυτταρικής μεμβράνης πεπτικών κυττάρων - η παρουσία τους υποδηλώνει επικείμενο κυτταρικό θάνατο. Κατά την απόπτωση οι προεξοχές λειτουργούν ως θέσεις συγκέντρωσης δεικτών φαγοκυττάρωσης και βοηθούν τα αποπτωτικά κύτταρα να ανιχνευθούν και να φαγοκυτταρωθούν από φαγοκύτταρα ή γειτονικά κύτταρα. Αποτυπώνεται επίσης απόπτωση συνοδευόμενη από δευτερογενή νέκρωση. Η εξέλιξη της απόπτωσης σε δευτερογενή νέκρωση συμβαίνει φυσιολογικά σε περιπτώσεις όπου τα αποπτωτικά κύτταρα απορρίπτονται σε περιοχές χωρίς φαγοκύτταρα (π.χ. αυλός του εντέρου). Υπό συνθήκες όπου προκαλείται ιδιαίτερη παθολογία, δευτερογενής νέκρωση μπορεί να παρατηρηθεί σε ιστούς με μεγάλο ρυθμό απόπτωσης ο οποίος ξεπερνά τη δυνατότητα απομάκρυνσης και ανανέωσης των κυττάρων (Silva *et al.*, 2010, Garg *et al.*, 2016, Mahajan *et al.*, 2016).

Στα πεπτικά λόβια των σαλιγκαριών που σιτίστηκαν με τη δίαιτα Σ5 η οποία περιείχε 5 % μείγμα αιθέριων ελαίων παρατηρείται νέκρωση των πεπτικών κυττάρων και κυττάρων ασβεστίου. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά των Farfar *et al.*, (2022) σχετικά με την επίδραση μείγματος καδμίου και χαλκού στον πεπτικό ιστό των σαλιγκαριών *Cornu aspersum*. Παρατήρησαν σημαντική μείωση του ύψους της επένδυσης και νεκρωτικά κύτταρα με κατακερματισμένους πυρήνες. Επιπλέον, παρέχοντας δολώματα που περιείχαν methiocarb, οι Hamed *et al.*, (2007) παρατήρησαν ότι μετά από δεκατέσσερις ημέρες, το κυτταρόπλασμα των πεπτικών κυττάρων φαινόταν εντελώς εκφυλισμένο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε κυτταρικό οίδημα και νέκρωση σε όλα τα κύτταρα ασβεστίου. Τέλος οι Mohammadein *et al.*, (2013) έχοντας συλλέξει σαλιγκάρια από μία μη και δύο ρυπασμένες τοποθεσίες παρατήρησαν ρήξη των μεμβρανών των πεπτικών κυττάρων και των κυττάρων ασβεστίου σε σαλιγκάρια από τις δύο ρυπασμένες περιοχές σε σύγκριση με τη φυσιολογική εμφάνιση αδένα σε σαλιγκάρια της μη ρυπασμένης περιοχής.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρόλο που τα αιθέρια έλαια συνήθως εκτιμώνται για τις μαλακιοκτόνες τους ιδιότητες, μέσω του εμπλουτισμού των ζωοτροφών με μείγμα αιθέριων ελαίων σε μορφή νανογαλακτώματος - σε χαμηλή συγκέντρωση 1% (τροφή Σ1) – παρατηρήσαμε ότι δεν προκαλούν καμία επίπτωση στην ανάπτυξη και ευζωία των σαλιγκαριών. Αυτό υποστηρίζεται από ευρήματα προηγούμενων ερευνών, που έδειξαν αύξηση βάρους συμπεριλαμβάνοντας αιθέριο έλαιο θυμαριού στη διατροφή σαλιγκαριών. Όσον αφορά στις δίαιτες Σ3 (3%) και Σ5 (5%), φάνηκε να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ιστολογία του πεπτικού αδένος των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών, με τη δίαιτα Σ3 να προκαλεί ταχύ ρυθμό απόπτωσης πεπτικών κυττάρων ο οποίος οδήγησε σε δευτερογενή νέκρωση και τη δίαιτα Σ5 να προκαλεί νέκρωση των πεπτικών κυττάρων και ρήξη της επένδυσης των πεπτικών λόβων.

Το πείραμα σίτισης διήρκησε εξήντα ημέρες και στη λήξη του δεν καταγράφηκαν σημαντικές θνησιμότητες για κανένα σιτηρέσιο. Συνοψίζοντας, η δίαιτα που είχε ποσοστό συμπερίληψης 1% του νανογαλακτώματος των αιθέριων ελαίων αποδείχθηκε ιδανική συγκριτικά με τις υπόλοιπες εμπλουτισμένες δίαιτες καθώς δεν επέφερε δυσμενείς επιπτώσεις στον ιστό του πεπτικού αδένος.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Χατζηιωάννου, Μ., & Στάικου, Α. (2015) Βιολογία και εκτροφή γαστεροπόδων, [ηλεκτρ. Βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5869>.
- Χατζηιωάννου, Μ., & Βαφείδης, Δ. (2016). Εργαστηριακές ασκήσεις ιστολογίας, [ηλεκτρ. Βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
- Abdel-Azeem, H. H., Osman, G. Y., Mohamed, A. H. (2023). Potential toxic effects of titanium oxide (TiO₂) nanoparticles on the biological, biochemical, and histological aspects of the land snail *Helix aspersa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(32), 78127-78138. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27666-y>
- Apostolou, K., Staikou, A., Sotiraki, S., Hatzioannou, M. (2021). An assessment of snail-farm systems based on land use and farm components. *Animals*, 11(2), 272. <https://doi.org/10.3390/ani11020272>
- Apostolou, K., Kladoudatos, D., Staikou, A., Sotiraki, S., Hatzioannou, M. (2023). Evaluation of production performance between two heliciculture farming systems. *Molluscan Research*, 43(3-4), 211-221. <https://doi.org/10.1080/13235818.2023.2258421>
- Araújo, F. D. P., Albuquerque, R. D. D. G. D., Rangel, L. D. S., Caldas, G. R., Tietbohl, L. A. C., Santos, M. G., Ricci-Junior, E., Thiengo, S., Fernandez, M. A., Albuquerque, J. A. D. S., Faria, R. X., Rocha, L. (2019). Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopi ochrantha* Mart. produces molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (*Schistosoma* hosts). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114, e180489. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180489>
- Araujo, R., Remon, J. M., Moreno, D., Ramos, M. A. (1995). Relaxing techniques for freshwater molluscs: trials for evaluation of different methods. *Malacologia*, 36(1), 29-41.
- Aydin, B., Barbas, L. A. L. (2020). Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture*, 520, 734999. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734999>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Barker, G. M. (2001). Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. *The biology of terrestrial molluscs*, Wallingford UK: CABI, 1-146. <https://doi.org/10.1079/9780851993188.0001>
- Bobori, D., Dimitriadi, A., Karasiali, S., Tsoumaki-Tsouroufli, P., Mastora, M., Kastrinaki, G., Feidantsis, K., Printzi, A., Koumoundouros, G., Kaloyianni, M. (2020). Common mechanisms activated in the tissues of aquatic and terrestrial animal

- models after TiO₂ nanoparticles exposure. *Environment international*, 138, 105611. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105611>
- Conte, R. (2015). Heliciculture: purpose and economic perspectives in the European community. *IST Journal*.
- Danilova, I. S., Fotina, T. I., Danilova, T. M. (2022). Histological Studies of Snails at Different Periods of Their Life Activity. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 5(3), 18-22. DOI: <https://doi.org/10.32718/ujvas5-3.04>
- Dawood, M. A., El Basuini, M. F., Zaineldin, A. I., Yilmaz, S., Hasan, M. T., Ahmadifar, E., El Asely, A. M., Abdel-Latif, H. M. R., Alagawany, M., Abu-Elala, N. M., Doan, H. V., Sewilam, H. (2021). Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens*, 10(2), 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>
- Delakorda, S. L., Letpfsky-Papst, I., Novak, T., Giovannelli, M., Hofer, F., Pabst, M. A. (2008). Application of elemental microanalysis to elucidate the role of spherites in the digestive gland of the helcid snail *Chilostoma lefeburiana*. *Journal of microscopy*, 231(1), 38-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02015.x>
- Dennis, M. M., Molnár, K., Kriska, G., Löw, P. (2021). Mollusca: Gastropoda. *Invertebrate histology*, 87-132. <https://doi.org/10.1002/9781119507697.ch4>
- Dickie, A., Streck, C., Roe, S., Zurek, M., Haupt, F., Dolginow, A. (2014). Strategies for Mitigating Climate Change in Agriculture: Abridged Report.
- Dimitriadis, V. K., Hondros, D. (1992). Effect of starvation and hibernation on the fine structural morphology of digestive gland cells of the snail *Helix lucorum*. *Malacologia*, 1992, 34(1-2), 63-73.
- Dimitriadis, V. K., Liosi, M. (1992). Ultrastructural localization of periodate-reactive complex carbohydrates and acid-alkaline phosphatases in digestive gland cells of fed and hibernated *Helix lucorum* (Mollusca: Helicidae). *J Moll Stud*, 58, 233-243.
- Dimitriadis, V. K. (2001). Structure and function of the digestive system in Stylommatophora. *The biology of terrestrial molluscs*, Barker G. M., Wallingford UK: CABI, 237-257. <https://doi.org/10.1079/9780851993188.0237>
- Dimitriadis, V. K., Konstantinidou, V. (2002). Origin of the excretory cells in the digestive gland of the land snail *Helix lucorum*. *Malacologia*, 44(1), 145-151.
- El Basuini, M. F., Shahin, S. A., Teiba, I. I., Zaki, M. A., El-Hais, A. M., Sewilam, H., Almeer, R., Abdelkhalek, N., Dawood, M. A. O. (2021). The influence of dietary coenzyme Q10 and vitamin C on the growth rate, immunity, oxidative-related genes, and the resistance against *Streptococcus agalactiae* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 531, 735862. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735862>
- Farfar, K., Bouraiou, C., Youbi, A., Fetnaci, I., Khebbeb, M. E., Djebbar, M. R., Bouslama, Z. (2022). Histopathology of the digestive gland of the snail *Cantareus aspersus* exposed chronically to cadmium and copper fungicide. Preprint. Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2280356/v1>
- Fink, S. L., Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.4.1907-1916.2005>

- Fournie, J., Chetail, M. (1984). Calcium dynamics in land gastropods. *American Zoologist*, 24(4), 857-870.
- Freccia, A., Sousa, S. M. D. N., Meurer, F., Butzge, A. J., Mewes, J. K., Bombardelli, R. A. (2014). Essential oils in the initial phase of broodstock diets of Nile tilapia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43, 1-7. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000100001>
- Garg, A. D., Romano, E., Rufo, N., Agostinis, P. (2016). Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy: mechanisms and clinical translation. *Cell Death & Differentiation*, 23(6), 938-951. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.5>
- Ghosh, S., Jung, C., Meyer-Rochow, V. B. (2016). Snail farming: an Indian perspective of a potential tool for food security. *Ann. Aquac. Res*, 3, 1024.
- Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A., Panebianco, A. (2014). Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Experimental parasitology*, 142, 7-10. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.028>
- Giarratana, F., Muscolino, D., Panebianco, F., Patania, A., Benianti, C., Ziino, G., Giuffrida, A. (2015). Activity of R (+) limonene against *Anisakis* larvae. *Italian Journal of Food Safety*, 4(4), 5499. doi: 10.4081/ijfs.2015.5499
- Guiller, A., Martin, M. C., Hiraux, C., Madec, L. (2012). Tracing the invasion of the Mediterranean land snail *Cornu aspersum aspersum* becoming an agricultural and garden pest in areas recently introduced. *PLoS One*, 7(12), e49674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049674>
- Guiller, A., Madec, L. (2010). Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1-20. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-18>
- Goddard, C. K., Martin, A. W. (1966). Carbohydrate metabolism. *Physiology of Mollusca*, Wilbur, M., Yonge, C. M., Academic Press, New York, 275–308.
- Hatzioannou, M., Issari, A., Neofitou, C., Aifadi, S., Matsiori, S. (2014). Economic analysis and production techniques of snail farms in southern Greece. *World J. Agric. Res*, 2(6), 276-279. DOI:10.12691/wjar-2-6-5
- Hamed, S. S., Abdelmeguid, N. E., Essawy, A. E., Radwan, M. A., Hegazy, A. E. (2007). Histological and ultrastructural changes induced by two carbamate molluscicides on the digestive gland of *Eobania vermiculata*. *Journal of Biological Sciences*, 7(6), 1017-1037.
- Hasan, M. T., Jang, W. J., Lee, S., Kim, K. W., Lee, B. J., Han, H. S., Bai, S. C., Kong, I. S. (2018). Effect of β -glucooligosaccharides as a new prebiotic for dietary supplementation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture. *Aquaculture research*, 49(3), 1310-1319. <https://doi.org/10.1111/are.13588>
- Oliveira Hashimoto, G. S. D. O., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>

- Hierro, I., Valero, A., & Navarro, M. C. (2006). In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* sl. *Phytomedicine*, 13(7), 527-531. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.05.001>
- Jaiswal, M., Dudhe, R., Sharma, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. 3 *Biotech*, 5, 123-127. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0214-0>
- Justino, C. H. D. S., Barros, L. A. (2008). In vitro evaluation of the resistance of the *Contracaecum* sp. larvae (Railliet & Henry, 1912) (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp.) (Poaceae). *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria*, 15(3), 122–125.
- Kougiagka, E., Apostologamvrou, C., Giannouli, P., Hatzioannou, M. (2022a). Quality factors of commercial snail fillets as affected by species. *Food Technology and Biotechnology*, 60(3), 330-337. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.03.22.7403>
- Kougiagka, E., Gkafas, G. A., Exadactylos, A., Hatzioannou, M. (2022b). Morphology and Genetic Structure Profile of Farmed Snails *Cornu aspersum aspersum* and *Cornu aspersum maximum* in Greece. *Sustainability*, 14(23), 15965. <https://doi.org/10.3390/su142315965>
- Laparra, J. M., Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research*, 61(3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.001>
- Linhart, Y. B., Thompson, J. D. (1995). Terpene-based selective herbivory by *Helix aspersa* (Mollusca) on *Thymus vulgaris* (Labiatae). *Oecologia*, 102, 126-132.
- Lobo-da-Cunha, A., Alves, Â., Oliveira, E., Guimarães, F., Calado, G. (2018). Endocytosis, lysosomes, calcium storage and other features of digestive-gland cells in cephalaspidean gastropods (Euopisthobranchia). *Journal of Molluscan Studies*, 84(4), 451-462. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyy034>
- Lobo-da-Cunha, A. (2019). Structure and function of the digestive system in molluscs. *Cell and tissue research*, 377(3), 475-503. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03085-9>
- Luis, A. I. S., Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Fraceto, L. F. (2019). Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 119-132. <https://doi.org/10.1111/raq.12229>
- Mahajan, A., Herrmann, M., Muñoz, L. E. (2016). Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE. *Frontiers in immunology*, 7, 35. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00035>
- Malheiros, D. F., Maciel, P. O., Videira, M. N., Tavares-Dias, M. (2016). Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>
- Massari, S., Pastore, S., (2014). Heliciculture and Snail Caviar: New Trends in the Food Sector", Misniakiewicz, M., Popek, S., Eds., *Polish Society of Commodity Science*, Cracow, Poland, ISBN 978- 83-940189-0-0.
- Mc Donnell, R., Yoo, J., Patel, K., Rios, L., Hollingsworth, R., Millar, J., Paine, T. (2016). Can essential oils be used as novel drench treatments for the eggs and juveniles of

- the pest snail *Cornu aspersum* in potted plants? *Journal of pest science*, 89, 549-555. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0690-y>
- Mohammadein, A., El-Shenawy, N. S., Al-Fahmie, Z. H. H. (2013). Bioaccumulation and histopathological changes of the digestive gland of the land snail *Eobania vermiculata* (Mollusca: Gastropoda), as biomarkers of terrestrial heavy metal pollution in Taif city. *Italian Journal of Zoology*, 80(3), 345-357. <https://doi.org/10.1080/11250003.2013.804957>
- Ngo, P. A., Neurath, M. F., López-Posadas, R. (2022). Impact of epithelial cell shedding on intestinal homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4160. <https://doi.org/10.3390/ijms23084160>
- Rygało-Galewska, A., Zglińska, K., Niemiec, T. (2022). Edible snail production in Europe. *Animals*, 12(20), 2732. <https://doi.org/10.3390/ani12202732>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS letters*, 584(22), 4491-4499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.046>
- Soares, B. V., Neves, L. R., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Dias, M. K. R., Chagas, E. C., Tavares-Dias, M. (2016). Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- Soares, B. V., Neves, L. R., Ferreira, D. O., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., Gonçalves, R. A., Tavares-Dias, M. (2017a). Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Veterinary Parasitology*, 234, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- Soares, B. V., Cardoso, A. C. F., Campos, R. R., Gonçalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., Tavares-Dias, M. (2017b). Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 469, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>
- Sutili, F. J., Gatlin III, D. M., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716-726. <https://doi.org/10.1111/raq.12197>
- Tavares-Dias, M. (2018). Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Ikefuti, C. V., Da Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M. V. N., Pilarski, F. (2016). Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with

- Melaleuca alternifolia*. Journal of fish diseases, 39(10), 1143-1152.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12447>
- Vokou, D., Tziolas, M., Bailey, S. E. R. (1998). Essential-oil-mediated interactions between oregano plants and Helicidae grazers. *Journal of chemical ecology*, 24, 1187-1202.
<https://doi.org/10.1023/A:1022446919104>
- Walker, G. (1970). The cytology, histochemistry, and ultrastructure of the cell types found in the digestive gland of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller). *Protoplasma*, 71, 91-109. <https://doi.org/10.1007/BF01294305>
- Zaitsev, O. O., Shchebentovska, O. M., Tybinka, A. M., Zakrevska, M. V., Blishch, H. I. (2020). Morphometry of the digestive glands of terrestrial mollusk *Cornu aspersum* (Gastropoda, Helicidae). *Zoodiversity*, 54(1), 75-88, DOI:10.15407/zoo2020.01.075
- Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., Klunter, A. M. (2018). Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal nutrition*, 4(2), 179-186.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>
- Ziegler, M., Eckstein, H., Köhler, H. R., Tisler, S., Zwiener, C., Triebkorn, R. (2021). Effects of the antidepressants citalopram and venlafaxine on the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*). *Water*, 13(13), 1722. <https://doi.org/10.3390/w13131722>
- Zucaro, A., Forte, A., De Vico, G., Fierro, A. (2016). Environmental loading of Italian semi-intensive snail farming system evaluated by means of life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 125, 56-67.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.03.045>

7. ABSTRACT

A dietary enrichment experiment was carried out using a mixture of nanoemulsified essential oils (oregano, lavender, clove, rosemary and artemisia) on *Cornu aspersum maximum* snails. Four diets were prepared, the control (M) consisting of commercial chicken feed with calcium carbonate added (30%), $\Sigma 1$, $\Sigma 3$ and $\Sigma 5$ which were prepared by enriching the control diet with the nanoemulsion at 1% (1ml/Kg of feed), 3% (3ml/Kg of feed) and 5% (5ml/Kg of feed) rates respectively. We used 500 snails per diet, each group was placed in a different section within a net covered greenhouse. The experiment's duration was 60 days, at the end of which all animals were collected, counted and 4 per feed were taken to histologically examine their digestive glands. The digestive glands of snails fed with the M diet showed normal morphology, with the $\Sigma 1$ diet slightly enlarged lumens and occasional strong presence of calcium spherules within calcium cells, with the $\Sigma 3$ diet apoptosis and secondary necrosis of digestive cells, with the $\Sigma 5$ diet necrosis of digestive cells and an abundance of calcium spherules within calcium cells. $\Sigma 1$ proved to be ideal compared to the other enriched diets due to causing no adverse effects on the tissue of the digestive glands.

Key words: *Cornu aspersum maximum*, feed enrichment, essential oils, nanoemulsion, digestive gland, apoptosis, necrosis.