



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Γενοτοξικότητα αιθέριων ελαίων»

ΔΕΛΟΥΣΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΒΟΛΟΣ 2014

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

«Genotoxicity of essential oils»

DEDOUSI VASILIKI

VOLOS 2014

« Γενοτοξικότητα αιθέριων ελαίων »

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορας Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**.

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

3) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, Λέκτορα Ιχθυοπαθολογίας κα Ελένη Γκολομάζου για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της μεταπτυχιακής διατριβής μου, αποτελούμενη από τους 1) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, και 2) Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, Μόνιμο Επίκουρο Καθηγητή για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Κώστα και Βούλα και στον αδελφό μου Γιώργο για την απεριόριστη συμπαράσταση, την οικονομική τους υποστήριξη όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και την ενθάρρυνση που μου έδωσαν στις δύσκολες στιγμές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου και συμφοιτήτριά μου Αμαλία Μπακαλού για την βοήθειά της και τη συμπαράστασή της όλο αυτό τον καιρό, αλλά και για όλα τα όμορφα χρόνια που περάσαμε μαζί και έκαναν τη φοιτητική μου ζωή στο Βόλο αξέχαστη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σ' όλους τους καθηγητές μου που κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου με βοήθησαν να πορευτώ σε νέα μονοπάτια γνώσης στο δρόμο για την αυτοπραγμάτωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών, που έχουν παραχθεί από διάφορα όργανα, π.χ. άνθη, μπουμπούκια, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, φλοιός, βότανα, ξύλο, φρούτα και ρίζες και υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για την εξαγωγή τους.

Η γενοτοξικότητα είναι μια ιδιότητα που κατέχεται από ορισμένες ουσίες που τις καθιστά επιβλαβή για την γενετική πληροφορία που περιέχεται σε οργανισμούς.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) αποτελεί πολύ σημαντικό εμπορικό είδος στην Ευρώπη, η εντατική της εκτροφή τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ. Επιπλέον, η επιβάρυνση των παράκτιων περιοχών και των θαλασσών με βαρέα μέταλλα, λόγω της αυξανόμενης βιομηχανικής και αστικής δραστηριότητας καθώς και της εντατικής αγροτικής καλλιέργειας με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων, έχει άμεση επίπτωση στο υδάτινο οικοσύστημα.

Στη παρούσα διατριβή μέρος των ηπατοκυττάρων και των βραγχιοκυττάρων απομονώθηκαν από τσιπούρες και εξετάστηκαν απευθείας για την εκτίμηση της γενοτοξικότητας των αιθέριων ελαίων, λουΐζα (*Aloysia triphylla*), γαρυφαλέλαιο (*Eugenia aromatica*), ρίγανη (*Origanum vulgare*), τειόδεντρο (*Melaleuca alternifolia*), άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι (*Juniperus communis*) και του αιθέριου έλαιο του φυτού κανέλα (*Cinnamomum zeylanicum*), με την τεχνική comet assay.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν χαμηλά ποσοστά καταστροφής του DNA σε όλα τα αιθέρια έλαια αλλά με διαφορετικά ποσοστά. Το μικρότερο ποσοστό καταστροφής κυττάρων στα βράγγια και στο ήπαρ των ιχθύων που μελετήθηκαν

εμφανίστηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το αιθέριο έλαιο *Cinamomum zeylanicum* (κανέλα). Το μεγαλύτερο ποσοστό καταστροφής κυττάρων είχε ο άρκευθος ή αγριοκυπαρίσι (*Juniperus communis*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η «ανάλυση κομητών» είναι μια πρακτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καταστροφής του DNA από αιθέρια έλαια.

Λέξεις κλειδιά: ανάλυση κομητών, comet assay, αιθέρια έλαια, γενοτοξικότητα, τσιπούρα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 1 |
| 1.1 Γενοτοξικότητα | 1 |
| 1.2 Τεχνικές ανίχνευσης γενοτοξικότητας | 2 |
| 1.2.1. Η τεχνική των μικροπυρήνων (Micronucleus Assay, MN)..... | 2 |
| 1.2.2. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (GE) | 2 |
| 1.2.3. Μέθοδος του «κομήτη» (Single Cell Gel Electrophoresis ή comet assay).... | 3 |
| 1.2.4.Ο έλεγχος χρωμοσωμικής αναδιάταξης (Chromosome aberration, Cab)..... | 3 |
| 1.3 Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε (Comet assay) | 3 |
| 1.4 Αιθέρια έλαια..... | 4 |
| 1.4.1 Κυριότερες αναισθητικές ουσίες, φυτικής προέλευσης για υδρόβιους οργανισμούς..... | 5 |
| 1.5 Χρήση των αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες | 6 |
| 1.5.1 .Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αναισθησία | 6 |
| 1.5.2 .Χρήση αιθέριων ελαίων ως ανοσοενισχυτικά..... | 8 |
| 1.5.3 Θεραπείες με αιθέρια έλαια..... | 10 |
| 1.5.5.1 Θεραπεία βακτηρίων με αιθέρια έλαια..... | 10 |
| 1.5.5.2 Θεραπεία μυκήτων με αιθέρια έλαια | 12 |
| 1.5.5.3 Θεραπεία παρασίτων με αιθέρια έλαια..... | 12 |
| 1.5.4. Συντήρηση προϊόντων με αιθέρια έλαια..... | 15 |
| 1.6. Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής | 16 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 17 |
| 2.1. Πειραματικά ψάρια | 17 |
| 2.2 Αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν | 20 |
| 2.2.1 Αιθέριο έλαιο <i>Eugenia aromatica</i> | 21 |
| 2.2.3 Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Aloysia triphylla</i> | 22 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4 Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Melaleuca alternifolia</i> | 23 |
| 2.2.5 Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Origanum vulgare</i> | 23 |
| 2.2.6 Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Juniperus communis</i> | 24 |
| 2.2.7. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | 25 |
| 2.4 Απομόνωση των κυττάρων | 28 |
| 2.5 Comet assay ή ανάλυση κομητών..... | 31 |
| 2.5.1 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών | 32 |
| 2.5.2 Λύση κυττάρων | 33 |
| 2.5.3 Ηλεκτροφόρηση | 34 |
| 2.5.4 Ανάλυση κομητών..... | 35 |
| 2.5.5 Εκτίμηση της βλάβης του DNA και υπολογισμός της παραμέτρου TM | 36 |
| 2.5.6 Στατιστική ανάλυση | 38 |
| 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 39 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 46 |
| 5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 50 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 51 |
| 7. ABSTRACT | 64 |

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενοτοξικότητα

Η γενοτοξικότητα είναι μια ιδιότητα που κατέχεται από ορισμένες ουσίες που τις καθιστά επιβλαβή για την γενετική πληροφορία που περιέχεται σε οργανισμούς. Ενώ υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το γενετικό υλικό DNA και RNA, η ιδιοκτησία της γενοτοξικότητας ισχύει μόνο για εκείνες τις ουσίες που προκαλούν πράγματι βλάβη στη γενετική πληροφορία. Υπάρχουν τρεις βασικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν οι γενοτοξίνες σε οργανισμούς, επηρεάζοντας τις γενετικές πληροφορίες τους. Οι γενοτοξίνες μπορεί να είναι καρκινογόνες ουσίες, μεταλλαξιογόνες ή παράγοντες που προκαλούν μετάλλαξη ή τερατογόνες και παράγοντες που προκαλούνται διάφορα ελαττώματα στη γέννηση (<http>¹).

Μεταλλαξιογόνοι παράγοντες γεννητικών κυττάρων / γενοτοξίνες είναι ουσίες που προκαλούν κληρονομικές, (μεταφέρονται στους απογόνους), μεταβολές στο γενετικό υλικό σε γεννητικά κύτταρα, δηλαδή σπερματοκύτταρα ή ωοκύτταρα (UNECE 2004), (ECVAM 2002). Ο όρος μεταλλαξιογόνο αναφέρεται σε μία ουσία η οποία συνεπάγεται με μεταδοτικές αλλαγές στη δομή του DNA (Maurici, *et al.*, 2005), που αφορούν ένα μόνο γονίδιο ή μία ομάδα γονιδίων. Γενοτοξίνες είναι μια ευρύτερη κατηγορία ουσιών που προκαλούν αλλαγές στη δομή ή τον αριθμό των γονιδίων μέσω χημικής αλληλεπίδρασης με το DNA ή / και τους στόχους μη-DNA (Maurici, *et al.*, 2005). Ο όρος γενοτοξικότητας χρησιμοποιείται γενικά.

1.2 Τεχνικές ανίχνευσης γενοτοξικότητας

Αρκετοί μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί τις δύο τελευταίες δεκαετίες, με σκοπό να προσδιορίσουν και να εκτιμήσουν τη γενοτοξικότητα τόσο σε κύτταρα όσο και σε αρχικά αναπτυξιακά στάδια των υδρόβιων οργανισμών. Οι τεχνικές ανίχνευσης της γενοτοξικότητας είναι (Magdolenova *et al.* 2014):

- ❖ Η τεχνική των μικροπυρήνων (MN)
- ❖ Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (GE)
- ❖ Μέθοδος του «κομήτη» (Single Cell Gel Electrophoresis ή comet assay)
- ❖ Ο έλεγχος χρωμοσωμικής αναδιάταξης (Chromosome aberration, Cab)

1.2.1. Η τεχνική των μικροπυρήνων (Micronucleus Assay, MN)

Οι μικροπυρήνες είναι μικρές μάζες χρωματίνης που προέρχονται από θραύσματα χρωμοσωμάτων ή ανευπλοειδίες κατά την κυτταρική διαίρεση. Η τεχνική αυτοί χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της γενοτοξικότητας αφού είναι αξιόπιστη, απλή, ευαίσθητη και ανεξάρτητη από τα καρωτυπικά χαρακτηριστικά των οργανισμών που μελετώνται.

1.2.2. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (GE)

Είναι μια τεχνική διαχωρισμού μορίων DNA. Το DNA κινείται με το ηλεκτρικό ρεύμα διαμέσου του πηκτώματος αγαρόζης και μεταναστεύει προς τον θετικό πόλο της συσκευής της ηλεκτροφόρησης, αφού είναι αρνητικά φορτισμένο φορτίο.

1.2.3. Μέθοδος του «κομήτη» (Single Cell Gel Electrophoresis ή comet assay)

Η τεχνική αυτή ανιχνεύει το κερματισμένο DNA σε μεμονωμένα κύτταρα και στην οποία τα κύτταρα από διάφορους ιστούς χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της έκθεσης των οργανισμών αυτών σε τοξικές ουσίες. Ακόμη χρησιμοποιείται και για την αξιολόγηση υδρόβιων οργανισμών. Είναι γρήγορη ευαίσθητη και απλή τεχνική.

1.2.4.Ο έλεγχος χρωμοσωμικής αναδιάταξης (Chromosome aberration, Cab)

Πρόκειται για μέθοδο καρυοτύπησης αφού μεταβάλλεται η δομή των χρωμοσωμάτων (Μαλανδράκης, 2011).

1.3 Η τεχνική Comet assay

Η τεχνική της comet assay – ανάλυση κομητών εισήχθη για πρώτη φορά από τους Östling and Johanson το 1984, ως μια τεχνική μικροηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετακίνησή του προς την άνοδο. Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Η τεχνική της comet assay είναι μια ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος για την ανίχνευση ρήξεως

κλώνου DNA σε μεμονωμένα κύτταρα. Η χρήση του έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια (Fairbairn *et al.*, 1995). Αργότερα, η τεχνική προσαρμόστηκε σε αλκαλικές συνθήκες από τους Singh *et al.* το 1988, οι οποίοι βελτίωσαν την τεχνική.

Η τεχνική αυτή αποτελεί στις μέρες μας ένα απλό, ευαίσθητο, γρήγορο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ανίχνευση και επιδιόρθωση της βλάβης του DNA, ποσοτικά και ποιοτικά, σε απομονωμένα ευκαρυωτικά αλλά και σε μερικά προκαρυωτικά κύτταρα και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς που κυμαίνονται από τη γενετική τοξικολογία ως την ανθρώπινη επιδημιολογία (Dhawan *et al.*, 2009).

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

1.4 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών, που έχουν παραχθεί από διάφορα όργανα, όπως άνθη, μπουμπούκια, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, φλοιός, βότανα, ξύλο, φρούτα και ρίζες

(Bakkali *et al.*, 2008). Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων, περιλαμβανομένης της απόσταξης με υδρατμούς, την υδροαπόσταξη, την μικροαπόσταξη με υδρατμούς εκχύλισης με οργανικό διαλύτη, απόσταξη με κενό και τα μικροκύματα (Βουρλιώτη-Αράπη 2010). Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί τα έλαια σε αναψυκτικά, είδη ζαχαροπλαστικής τροφίμων κ.λπ., και η βιομηχανία καλλυντικών τα χρησιμοποιεί σε αρώματα, στο δέρμα στα προϊόντα περιποίησης μαλλιών, αρωματοθεραπείες, κλπ., ενώ η φαρμακευτική βιομηχανία τα χρησιμοποιεί για τις λειτουργικές ιδιότητες (π.χ. φάρμακα).

Διάφορα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναισθητικά, τα οποία συνήθως προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων, αφού πρώτα διαλυθούν στο νερό στο οποίο βρίσκονται τα ψάρια (Τσαντήλας και συν., 2005) και ως ανοσοενισχυτικά σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (Summer and Smith 1990, Ross L.G. and Ross B. 1999, Iwama *et al.* 1997). Ακόμη τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί σε θεραπείες βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων, αλλά και στη συντήρηση διαφόρων προϊόντων (Christaki *et al.* 2012).

1.4.1 Κυριότερες αναισθητικές ουσίες, φυτικής προέλευσης για υδρόβιους οργανισμούς

Κατά την ελληνική αρχαιότητα μία σειρά βοτάνων και παρασκευασμάτων χρησιμοποιούνταν ως παυσίπονα κατά των νευραλγιών, ως υπνωτικά και κατευναστικά (Μυρωνίδου-Τζουβελέκη και συν. 2009). Στον Πίνακα 1 αναγράφονται ορισμένα από αυτά.

Πίνακας 1: Αναισθητικές ουσίες φυτικής προέλευσης (Μυρωνίδου-Τζουβελέκη και συν. 2009).

| |
|-------------------------------------------------------|
| Άνηθος (<i>Anethum graveolens</i>) |
| Γλυκισίδα (<i>Pimpinella anisum</i>) |
| Γλυκόριζα (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) |
| Δίκταμο (<i>Origanum dictamnus</i>) |
| Έρπυλλος (<i>Thymus serpyllum</i>) |
| Κώνειο (<i>Conium maculatum</i>) |
| Μήκων (<i>Papaver somniferum</i>) |
| Μηκωνίς (<i>Euphorbia exiguua ή vetusa</i>) |
| Πήγανον: (α) Απήγανος (<i>Ruta graveolens</i>) |
| & |
| (β) Αγριοπήγανος (<i>Ruta Montana</i>) |
| Υοσκούαμος (<i>Hyoscyantus albus</i>) |

1.5 Χρήση των αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες

1.5.1 Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αναισθησία

Η λέξη « αναισθησία » επινοήθηκε από τον Oliver Wendell Holmes το 1846 (Fishbein 1976).

Η χρήση των αναισθητικών στον τομέα της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό στο χειρισμό κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης και της μεταφοράς των γεννητόρων, καθώς επίσης τα αναισθητικά χρησιμοποιούνται για να

μειωθεί το επίπεδο του στρες που συνδέονται με τις εν λόγω διαδικασίες (Summer and Smith 1990, Ross L.G. and Ross B. 1999, Iwama *et al.* 1997).

Το ιδανικό αναισθητικό για ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών πρέπει να εξασφαλίζει γρήγορη αναισθησία και ανάνηψη, να είναι ασφαλές για τα ψάρια και το χρήστη, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς και να είναι οικονομικό και εύχρηστο. Τα αναισθητικά συνήθως προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων, αφού πρώτα διαλυθούν στο νερό στο οποίο βρίσκονται τα ψάρια (Τσαντήλας και συν., 2005).

Σε μελέτη που έγινε στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio* L.) διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα του αιθέριου ελαίου τειόδεντρου (TeaTree Oils) ως αναισθητικό, κατά την εκτίμηση των αλλαγών συμπεριφοράς και ανταπόκρισης όταν μεταφερόταν τα ψάρια έξω από το νερό. Όλες οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν είχαν σαν αποτέλεσμα την καταστολή και την ακινητοποίηση. Η έκθεση σε περίσσεια 30 min σε μία συγκέντρωση $0,5 \text{ ml L}^{-1}$ προκάλεσε θνησιμότητα. Το TTO εμφανίζει διακριτά γενική αναισθησία, όπως ιδιότητες, και τις βασικές απαιτήσεις για ένα ισχυρό αναισθητικό ψαριών (Grzegorz 2011, Hajek 2011).

Το έλαιο γαριφάλου είναι ελαιώδες υγρό το οποίο περιέχει τις δραστικές ουσίες ευγενόλη και ισοευγενόλη. Είναι οικονομικό και εύκολο στη χρήση, έχει αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, θεωρείται αρκετά ασφαλής για τα ψάρια και τους ανθρώπους, και δεν απαιτείται μεγάλη περίοδος αναμονής μετά τη χρήση του (Ross and Ross 2008). Ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια σε ανθρώπους, θηλαστικά, στα ψάρια και στα αμφίβια (Mitchell 2009).

Έτσι, σύμφωνα με τον Filiciotto (2012), η ευγενόλη είναι ένα αποτελεσματικό αναισθητικό, και δεν επηρεάζει αιματολογικές παραμέτρους στην περίπτωση του

λαβρακιού. Ωστόσο, η έκθεση σε αναισθητικά μπορεί να προκαλέσει άγχος, αλλά σε σύγκριση με το έλαιο σκελίδας σκόρδου ως αναισθητικό, έχει καλύτερα αποτελέσματα από ότι τα άλλα χημικά αναισθητικά στις επιδόσεις κολύμβησης (Anderson *et al.* 1997). Μια άλλη συγκριτική έρευνα που έγινε για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του ελαίου γαρίφαλου ως αναισθητικό σε νεαρά λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρες (*Sparus aurata*) σε σύγκριση με την phenoxyethanol (Mylonas *et al.* 2005), έδειξε ότι το γαριφαλέλαιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα αποτελεσματικό αναισθητικό σε περίπου 10 φορές μικρότερες δόσεις της φαινοξυαιθανόλης. Σύμφωνα με τους Renault *et al.* (2011) δείχνουν ότι υπάρχει κατάλληλη ευγενόλη για την αναισθησία στο ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla Anguilla*), επειδή επηρεάζει τη κορτιζόλη. Επίσης, η ευγενόλη είναι ένα κατάλληλο αναισθητικό για αναισθησία χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) (Peng 2011).

Το φυτό *Aloysia triphylla* στη παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιείται ως θεραπεία για την αϋπνία και το άγχος. Πρόσφατα, το αιθέριο έλαιο του φυτού αυτού έχει καθιερωθεί ως αναισθητικό για την υδρόβια ζωή και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Parodi *et al.* 2013).

1.5.2 Χρήση αιθέριων ελαίων ως ανοσοενισχυτικά

Τα εκχυλίσματα των φυτών *Viscum album*, *Urtica dioica* και *Zingiber officinale*, προστιθέμενα στη διατροφή της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) σε ποσοστό 2% του βάρους του σώματος παρουσιάζουν κάποια επίδραση στην έμφυτη ανοσία της. Πιο συγκεκριμένα ενεργοποιήθηκε ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης και της εξωτερικής οξειδωτικής δραστηριότητας των λευκοκυττάρων της ιριδίζουσας πέστροφας (Düğenci *et al.* 2003).

Ο σπόρος του βοτάνου *Achyranthes aspera* Linn έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό (ειδική ή μη ανοσία) σύστημα του ινδικού κυπρίνου (*Catla catla*) ανυψώνοντας τα επίπεδα των ερυθρών αντισωμάτων και της γλουβολίνης. Το εκχύλισμα του φυτού *Catharanthus roseus* στη διατροφή του κυπρίνου ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό του σύστημα (Rao and Chakrabarti 2005), ενώ τα εκχυλίσματα του φυτού *Tinospora cordifolia* σε συγκέντρωση 8 mg/kg αυξάνουν τον αριθμό των αντισωμάτων, τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και προσφέρουν προστασία ενάντια στο *Aeromonas hydrophila* στην εκτροφή του *Oreochromis mossambicus* (Sudhakaran *et al.* 2006).

Σε άλλο πείραμα που έγινε με συμπλήρωση της διατροφής της τιλάπιας (*Oreochromis mossambicus*) με εκχύλισμα ακετόνης (1% w/w) από φαρμακευτικά φυτά (*Bermuda grass*, *Cynodon dactylon* *beal*, *Aegle marmelos* *wintercherry*, *Withania somnifera*; and ginger, *Zingiber officinale*), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τιλάπια που τρέφονταν με τα φυτικά εκχυλίσματα βελτίωσε την ανάπτυξή της και ενισχύθηκαν οι μη – ειδικοί μηχανισμοί ανοσίας. Το εκχύλισμα ακετόνης από *W.somnifera* έδειξε την ισχυρότερη αναστολή του *Vibrio* spp. και *Photobacterium* (Immanuel *et al.*, 2009).

Τα εκχυλίσματα βοτάνων *Ocinum sanctum* και *Withania somnifera* ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και το ρυθμό μετατρεψιμότητας και μειώνεται το ποσοστό θνησιμότητας (Sivarama *et al.* 2004).

Σε έρευνα των Kim *et al.*, (2007), έδειξε 80% υψηλότερη δραστηριότητα λυσοζύμης και 66% υψηλότερη δραστηριότητα φαγοκυτταρικής λευκοκυττάρων στο καλκάνι ελιάς (*Paralichthys olivaceus*) που τρέφονταν με δίαιτα που περιέχει μια μικτή

καλλιέργεια, αποσπάσματα από τα μανιτάρια *Phellinus linteus* και *Coriolus versicolor*. Ο ροφός (*Epinephelus bruneus*), τρέφονταν με μία δίαιτα ενισχυμένη με εκχύλισμα αιθανόλης του μανιταριού *Phellinus linteus* για 30 ημέρες και έδειξαν εναλλακτική δραστηριότητα σημαντικά υψηλότερη ($P < 0,05$) του συμπληρώματος, δραστηριότητα λυσοζύμης στον ορό, φαγοκυτταρική δραστηριότητα, φαγοκυτταρικός δείκτης και η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε σχέση με τα ψάρια που τρέφονταν με τη δίαιτα ελέγχου χωρίς εκχύλισμα μανιταριού (Harikrishnan *et al.*, 2011a).

1.5.3 Θεραπείες με αιθέρια έλαια

1.5.5.1 Θεραπεία βακτηρίων με αιθέρια έλαια

Αρκετές εναλλακτικές λύσεις για την χρήση των αντιβιοτικών έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην υδατοκαλλιέργεια. Η χρήση των αβλαβείς μικροοργανισμών για να αποφευχθεί η βακτηριακή μόλυνση σε υδρόβιους οργανισμούς έχει δοκιμαστεί σε υδατοκαλλιέργειας. Μια άλλη πηγή των εναλλακτικών θεραπειών είναι τα αιθέρια έλαια, τα οποία είναι φυσικά συστατικά από φυτά που είναι γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλείς ουσίες (GRAS). Λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων, τα αιθέρια έλαια μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικές και θεραπευτικές μέθοδοι στην υδατοκαλλιέργεια (Romero *et al.*, 2000).

Τα εκχυλίσματα των βοτάνων, *Ocimum sanctum* και *Withania somnifera* προστατεύουν τα νεαρά άτομα του *Epinephelus tauvina* από το παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi* (Sivarama *et al.* 2004).

Η αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* παρουσιάζουν και τα τέσσερα χερσαία φυτά (*Ricinus communis*,

Phyllanthus niruri, *Leucas aspera* και *Manihot esculenta*) καθώς και τα δύο φύκη *Ulva lactuca* και *Sargassum wightii* στα ανήλικα άτομα του καβουριού (*Peneaus indicus*) (Immanuel *et al.*, 2004).

Τμήμα του δέντρου neem (*Azadirachta indica*) και φύλλα ελέγχθηκαν έναντι των βακτηρίων *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio alginolyticus* τα οποία απομονώθηκαν από τις καλλιεργούμενες γαρίδες. Υδατικό εκχύλισμα των φύλλων neem δεν παράγει καμία ανασταλτική ζώνη, ενώ ο χυμός που παράγεται από το δέντρο neem έχει ανασταλτική ζώνη, που έδειξε γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση του χυμού neem στα δύο βακτήρια. Η Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC) για το *V. parahaemolyticus* και το *V. alginolyticus* ήταν 3,13 και 6,25%, αντίστοιχα. Η Ελάχιστη Συγκέντρωση Βακτηριοκτόνος (MBC) για το *V. parahaemolyticus* και το *V. alginolyticus* ήταν 12,50 και 25,00%, αντίστοιχα. Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι ο χυμός neem είναι ένας αντιβακτηριακός παράγοντας και είναι χρήσιμος για την αναστολή των δονακίων σε γαρίδες (Banerjee *et al.*, 2012).

Μια πρόσφατη έκθεση από τους Yeh *et al.*, (2009) ανέφεραν ότι το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum kanehirae*, (δέντρο κάμφορας), έδειξε αντιβακτηριακή δράση κατά διαφόρων παθογόνων των υδρόβιων ζώων, που έλαβαν θεραπεία με εκχυλίσματα ζεστού νερού από κλαδιά του *Cinnamomum kanehirae* και ακόμη έδειξαν μια σημαντική μείωση στην ευαισθησία τους σε *Vibrio alginolyticus*.

Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι το γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) που τρέφεται με το φυσικό αιθέριο έλαιο ρίγανης που εξάγεται από *Origanum heracleoticum*, σε πειραματική διαδικασία, είχε το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας μετά από μόλυνση *Aeromonas hydrophila* σε σύγκριση με τα ψάρια που τρέφονται με ένα συνδυασμό

καρβακρόλης και θυμόλης, τα οποία είναι τα κύρια δραστικά συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Zheng *et al.*, 2009).

1.5.5.2 Θεραπεία μυκήτων με αιθέρια έλαια

Τα έλαια από θυμάρι, κανέλα, δυόσμο και βασιλικό, αναστέλλουν πλήρως όλους τους υπό εξέταση μύκητες. Το κύμινο είναι ανασταλτικό στα 2000 ppm κατά των μυκήτων *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* (3000 ppm) και κατά του *A. ochraceus* και *Fusarium moniliforme*. Τα *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* και *F. moniliforme* είχαν ανασταλεί πλήρως από γλυκάνισο (4500 ppm). Ωστόσο, το χαμομήλι σε όλες τις συγκεντρώσεις ήταν μερικώς αποτελεσματικό έναντι των τοξικογόνων μυκήτων (Solima and Badeaa 2002).

1.5.5.3 Θεραπεία παρασίτων με αιθέρια έλαια

Σε μια πειραματική διαδικασία ερευνήθηκε η ανοσορυθμιστική δράση ριγανέλαιου ως θεραπεία κατά μυξοσποριδίων παρασίτων στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα του μυτακιού (*Diplodus puntazzo*). Ψάρια φυσικώς μολυσμένα με *Mycobolus* sp, ένα παράσιτο που επηρεάζει κυρίως τη νεφρική διάμεσου ιστού, κατεργάστηκαν με στοματική χορήγηση του ελαίου *Origanum*. Ένα μήνα μετά τη θεραπεία προκλήθηκε σημαντική μείωση στο ποσοστό προσβολής και στην ένταση της παρασίτωσης. Ακόμη δεν υπήρχε ιστοπαθολογική απόδειξη της τοξικότητας (Karagouni *et al.*, 2005), ενώ σε άλλη πειραματική διαδικασία που έγινε στην τσιπούρα (*Sparus aurata*), για την αντιμετώπιση του μυξοσποριδίου παρασίτου *Polysporoplasma sparidis*, αποδείχθηκε πως το αμπρόλιο ήταν πιο αποτελεσματικό στην εξάλειψη του παρασίτου από το έλαιο *Origanum* (Athanasopoulou *et al.*, 2004).

Μια ακόμη μελέτη που διεξήχθη αξιολόγησε τις αντιπαρασιτικές ιδιότητες του μεθανολικού εκχυλίσματος *Artemisia annua*. Δείγματα ιχθύων μαύρης τυλάπιας (*Sarotherodon melanotheron*) ελήφθησαν και εκτίθενται σε συνθήκες που ενίσχυσαν τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου για μία εβδομάδα, μετά από την οποία τα ψάρια που εμφανίζουν σημάδια παρασίτου απομονώθηκαν. Αποτελέσματα της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων αποκάλυψε ένα εξαρτώμενο από το χρόνο εκτοπίσεως των παρασίτων από το σημείο προσάρτησης, πήξης και θάνατο των κυττάρων του παρασίτου που εκτίθενται στο εκχύλισμα. Έτσι, οι δευτερογενείς μεταβολίτες του *A. annua* και τα αιθέρια έλαιά της έχουν αντιπαρασιτικές ιδιότητες εναντίον μονογενών τμηματοειδών όπως διαπιστώθηκε στην περίπτωση του παράσιτα της μαύρης τυλάπιας (*S. melanotheron*). (Oriakrono *et al.*, 2012).

Δύο αιθέρια έλαια που προέρχονται από τα φυτά *Lavandula angustifolia* και *Lavandula intermedia* ερευνήθηκαν για οποιαδήποτε αντιπαρασιτική δράση έναντι των ανθρώπινων παθογόνων πρωτόζωων *Giardia duodenalis* και *Trichomonas vaginalis* και του παρασίτου *Hexamita inflata* των ιχθύων, τα οποία όλα έχουν σημαντικές μολύνσεις και οικονομικές επιπτώσεις. Η μελέτη έδειξε ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις ($\leq 1\%$) των *L. angustifolia* και *Lavandula. intermedia* μπορούν να εξαλείψουν εντελώς τα *T. vaginalis*, *G. duodenalis* και *H. inflata in vitro*. Σε συγκέντρωση 0,1%, το αιθέριο έλαιο *L. angustifolia* βρέθηκε να είναι ελαφρώς πιο αποτελεσματικό από το *Lavandula intermedia* ενάντια στα *G. duodenalis* και *H. inflata* (Moon *et al.*, 2006).

Το αιθέριο έλαιο του σκόρδου έχει δραστηριότητα ευρέως φάσματος κατά των παρασίτων *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Giardia* και *Leishmania*. Τα αιθέρια έλαια *Cochlospermum planchonii* και *Croton cajucara* αναστέλλουν ειδικώς τα παράσιτα

Plasmodium falciparum και *Leishmania amazonensis*, αντίστοιχα. (Anthony *et al.*, 2005).

Ichthyophthirius multifiliis (Ich), ένα σημαντικό παράσιτο ψαριών, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές απώλειες στον τομέα των υαδατοκαλλιεργειών. Η ρίζα του φλοιού της λευκής μουριάς *Morus alba* αξιολογήθηκε για αντιπρωτοζωική δραστικότητα του έναντι του *Ichthyophthirius multifiliis*. Ο φλοιός έγινε σκόνη και εκχυλίστηκε με 1 από 5 οργανικών διαλυτών : πετρελαϊκός αιθέρας , χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη ή μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν , διαλύθηκαν σε 0.1 % (v/v) DMSO, και χρησιμοποιήθηκαν έναντι του Ich. Η ακετόνη και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα μείωσαν σημαντικά την επιβίωση των παραίτων Ich, *tomonts* και *theronts*. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα σε 50 mg L^{-1} εξάλειψε όλα τα *tomonts*. σε. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις (2 και 4 mg L^{-1}) ακετόνης και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα δεν μπορούσαν να σκοτώσουν όλους τους *theronts* μετά από 4 ώρες έκθεσης, αλλά μία σημαντική μείωση σε μολυσματικότητα *theront* παρατηρήθηκε μετά 30 λεπτά προεργασίας με τα εκχυλίσματα . Έτσι τα εκχύλιση της ρίζας του φλοιού της λευκής μουριάς *M. alba* μπορεί να είναι μια δυνητική νέα μέθοδος, αλλά είναι ασφαλής και αποτελεσματικό φάρμακο για τον έλεγχο του παρασίτου Ich (Fu *et al.*, 2014).

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να αξιολογήσει την αντιπαρασιτική δράση των δραστικών συστατικών από *Toddalia asiatica* ενάντια του *I. multifiliis*. Αποτελέσματα από την *in vitro* δοκιμασία παρασίτων αποκαλύφθηκε ότι η chelerythrine και η chloroxylinone θα μπορούσαν να είναι 100 % αποτελεσματική έναντι του παρασίτου *I. multifiliis* σε συγκέντρωση $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ και $3,5 \text{ mg L}^{-1}$, με τη μέση αποτελεσματική

συγκέντρωση (EC_{50}) από $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ και $1,90 \text{ mg L}^{-1}$, αντίστοιχα. Η οξεία τοξικότητα (LC_{50}) chelerythrine για χρυσόψαρα ήταν $3,3 \text{ mg L}^{-1}$ (Shan *et al.*, 2014).

1.5.4. Συντήρηση προϊόντων με αιθέρια έλαια

Αρωματικά φυτά, γνωστά ως βότανα και μπαχαρικά, έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα ως λαϊκή ιατρική και ως συντηρητικά σε τρόφιμα. Τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά, όπως η ρίγανη, δενδρολίβανο, φασκόμηλο, γλυκάνισο, βασιλικός, κλπ., προέρχονται από την περιοχή της Μεσογείου. Ως εκ τούτου, τα αρωματικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους, έχουν τη δυνατότητα να γίνουν νέες ουσίες για τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου και των ζώων (Christaki *et al.* 2012).

Σε πείραμα που έγινε με αιθέρια έλαια βοτάνων θυμαριού (*Thymus vulgaris*) και ρίγανης (*Origanum vulgare*) στα ασιατικά λαβράκια (*Lates calcarifer*) 400gr, προστέθηκαν 0,05 % (vol/vol) των αιθέριων ελαίων ως συντηρητικά. Με βάση τα αποτελέσματα των αισθητηρίων καθώς και οι βακτηριολογικές εξετάσεις έδειξαν πως η προσθήκη ρίγανης και θυμαριού ως αιθέρια έλαια μπορούν να επιβραδύνουν σημαντικά τη διαδικασία της αλλοίωσης. Τα ψάρια που έλαβαν θεραπεία με αυτά τα αιθέρια έλαια ήταν ακόμη κατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο ακόμη και μετά από 33 μέρες αποθήκευσης (Harpaz *et al.*, 2003).

Η διαιτητική προσθήκη ενός εμπορικού μείγματος με αιθέρια έλαια, συμπεριλαμβανομένων της θυμόλης, παρουσίασαν μείωση στην *E. coli* CFU σε αναπτυσσόμενα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο πληθυσμός *Lactobacillus* δεν επηρεάστηκε (Jang *et al.* 2007). Σε αντίθεση, με μία διαιτητική αγωγή με 1000 mg/kg ζωοτροφής θυμάρι, ρίγανη, μαντζουράνα ή δεντρολίβανο, δεν επηρέασε την ολική μικροβιακή χλωρίδα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, τα

κολοβακτηρίδια, τα αναερόβια ή το *Clostridium perfringens* στα κοτόπουλα (Cross *et al* 2007, Mühl and Liebert, 2007).

Σε πειραματική διαδικασία που έγινε, η διάρκεια ζωής των φιλέτων κυπρίνου έχει επεκταθεί με εμβάπτιση των φιλέτων σε ένα διάλυμα που περιέχει τόσο καρβακρόλη όσο και θυμόλη και αυτό οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του αριθμού των βακτηρίων (Kim *et al*, 1995, Mejlholm and Dalgaard, 2002, Mahmoud *et al*. 2006).

Επίσης, και η θεραπεία των φιλέτων πέστροφας με αιθέριο έλαιο ρίγανης επέκτεινε τη διάρκεια ζωής από 7 έως 8 ημέρες για τα νωπά φιλέτα πέστροφας (Pyrgotou *et al.*, 2010). Παραδείγματα της *in vivo* χρήσης των αιθέριων ελαίων στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας είναι λιγοστές. Οι λίγες μελέτες που υπάρχουν έχουν αναφέρει τα αποτελέσματα των αιθέριων ελαίων για γαρίδες και μερικά ψάρια.

1.6. Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

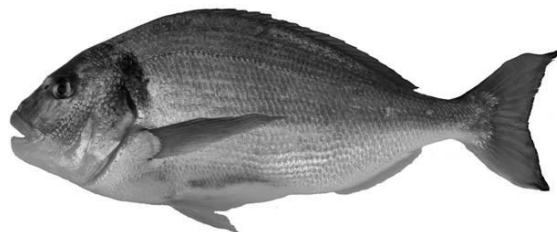
Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η μελέτη *in vitro* της γενοτοξικότητας αιθέριων ελαίων, τα οποία έχουν αποδειχθεί από άλλες έρευνες (*in vivo*), ότι έχουν αναισθητική δράση. Η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί σε ηπατοκύτταρα και βραγχιοκύτταρα τσιπούρας (*Sparus aurata*) είναι η comet assay – ανάλυση κομητών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικά ψάρια

Το είδος ψαριού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) (Εικ. 7) και η κατάταξή του είναι η εξής ([http²](#)):

| | |
|-------------------------|----------------|
| Βασίλειο : | Ζώα |
| Συνομοταξία : | Χορδωτά |
| Υποσυνομοταξία : | Σπονδυλωτά |
| Ομοταξία : | Οστεϊχθύες |
| Κλάση : | Ακτινοπερύγιοι |
| Υπερτάξη : | Τελεόσταιοι |
| Τάξη : | Περκόμορφη |
| Οικογένεια : | Sparidae |
| Γένος : | <i>Sparus</i> |
| Είδος : | <i>Aurata</i> |



Εικόνα 1: Τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)

Γενικά η τσιπούρα είναι ευρύαλο είδος και έχει ευρεία εξάπλωση από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα μέχρι τον Ατλαντικό Ωκεανό και νότια μέχρι τη Σενεγάλη (Εικ.8). Ανήκει στην οικογένεια των *Sparidae* και παρουσιάζει μεγάλη εμπορική αξία και ζήτηση. Χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό αύξησης που την καθιστά πολύ δημοφιλή στη βιομηχανία υδατοκαλλιεργειών. Το κρέας της τσιπούρας είναι λευκό με ευχάριστη υφή και είναι εξαιρετικής ποιότητας ([http³](#)). Τρέφεται με δίθυρα και καρκινοειδή. Παρουσιάζει προτίμηση στις λιμνοθάλασσες και σε παράκτια συστήματα με αμμώδεις βυθούς και με λειμώνες Ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*) (Breber and Strada 1995). Μετακινείται σε βαθύτερα νερά κατά την περίοδο της αναπαραγωγής, τέλη φθινοπώρου με χειμώνα. Είναι ερμαφρόδιτο είδος, με πρωτανδρική εμφάνιση και μετά το δεύτερο έτος της ηλικίας της πολλά άτομα μετατρέπονται σε θηλυκά ([http³](#)).

Η εκτροφή της τσιπούρας πραγματοποιούνταν παραδοσιακά είτε στις μεσογειακές παράκτιες λιμνοθάλασσες είτε σε λίμνες υφάλμυρων και αλμυρών νερών, ειδικά στη Βόρεια Αδριατική θάλασσα στην Ιταλία (Παπουτσόγλου 2008). Αυτά τα εκτατικά συστήματα εκτροφής ψαριών, ενεργούσαν ως φυσικές παγίδες εκμεταλλευόμενες τις φυσικές μεταναστεύσεις των νεαρών ατόμων από τη θάλασσα για αναζήτηση τροφής. Η επανεισαγωγή ιχθύων γινόταν συνήθως με τη χρήση άγριου γόνου και νεαρών ατόμων, που συλλέγονταν από εξειδικευμένους ψαράδες. Μέχρι τα τέλη του 1970, η μειωμένη διαθεσιμότητα του άγριου γόνου ενίσχυσε την ανάπτυξη τεχνικών αναπαραγωγής, για τη θέσπιση έως το τέλος της δεκαετίας του 1980 ενός συστήματος παραγωγής επαρκών ποσοτήτων γόνου (Dimitriou 2000).

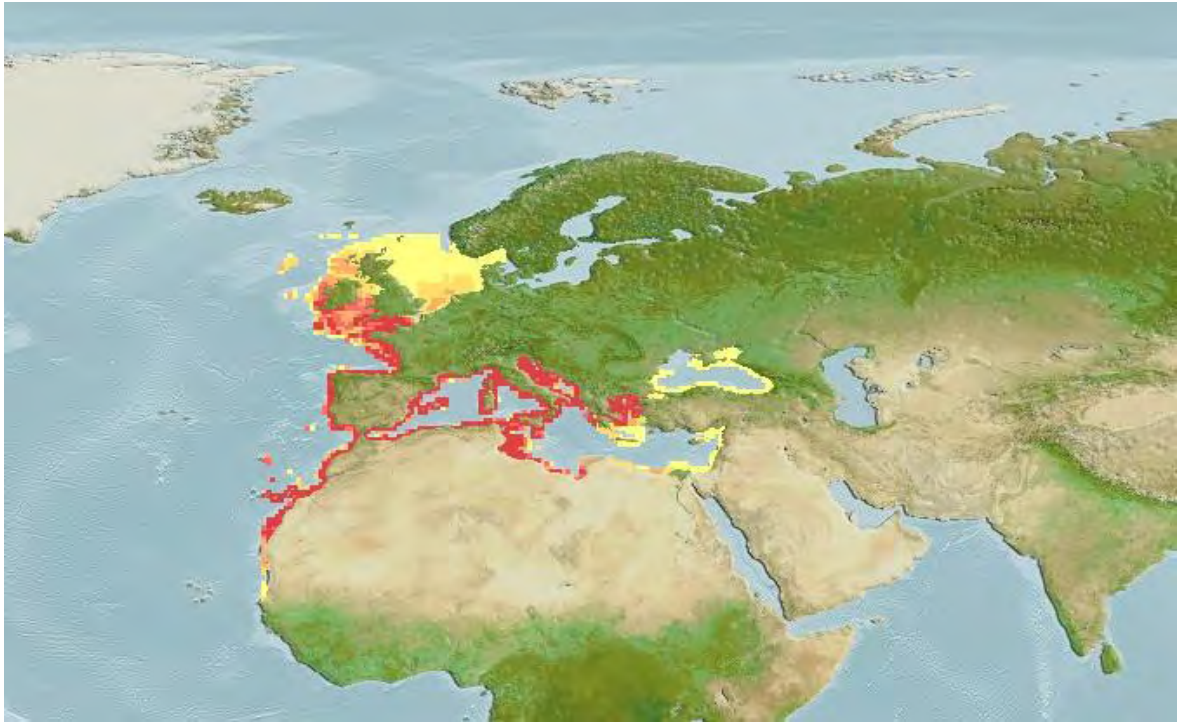
Οι τσιπούρες εκτρέφονται σε εκτατικά συστήματα εκτροφής σε λιμνοθάλασσες ή εντατικά σε δεξαμενές ή κλωβούς. Προς το παρόν, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής

προέρχεται από την εντατική εκτροφή, με μέση πυκνότητα 20 - 100 kg m³ και FCR 1,5 - 2 (FAO 2013). Η εκτατική εκτροφή παραμένει μια παραδοσιακή δραστηριότητα σε ορισμένες περιοχές, αλλά με πολύ χαμηλό αντίκτυπο στην αγορά (Sola *et al.* 2006).

Το 2010, η παγκόσμια παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας ήταν 140.000 τόνοι (FAO 2013). Στη Μεσόγειο, οι κύριοι παραγωγοί τσιπούρας είναι η Ελλάδα, η Τουρκία, η Ισπανία και η Ιταλία. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, λειτουργούσαν περίπου είκοσι εκκολαπτήρια τσιπούρας στη Μεσόγειο. Μέχρι το 2006 πάνω από 65 εκκολαπτήρια διανέμονταν στην Κροατία, την Κύπρο, τη Γαλλία, την Ελλάδα, την Ιταλία, το Μαρόκο, την Πορτογαλία, την Ισπανία και στην Τυνησία (FAO 2006).

Οι ανεκτοί παράγοντες του περιβάλλοντος για το είδος οι οποίοι επηρεάζουν την εξάπλωση του είδους είναι η θερμοκρασία (η τσιπούρα, απαντάται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5°C - 6°C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25°C - 27°C. Μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι οι 3°C ενώ η ελάχιστη οι 5°C, η αλατότητα (η τσιπούρα, απαντάται σε νερά με αλατότητα 7 psu έως και 42 psu. Οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 psu και 42 psu), το διαλυμένο O₂ (σε συνθήκες εκτροφής έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι το λιγότερο 3,5mg/L, σε θερμοκρασία γύρω στους 25°C χωρίς να παρουσιαστούν θάνατοι. Σε κάθε περίπτωση το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία είναι το 90%) (Barnabe, 1990) και η θολερότητα (Η τσιπούρα δε φαίνεται να προτιμά τα θολά νερά των εκβολών των ποταμών ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές).

Οι Μεσογειακές χώρες σήμερα, αποτελούν τις κυριότερες χώρες παραγωγής της τσιπούρας στον κόσμο. Στην Ελλάδα, η τσιπούρα μαζί με το λαβράκι αποτελούν τη μεγαλύτερη μερίδα της παραγωγής αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες.



Εικόνα 2: Περιοχή κατανομής της τσιπούρας(<http>³).

2.2 Αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν

Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla* (λουίζα), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica* (γαρυφαλέλαιο), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (ρίγανη), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (τεϊόδεντρο ~ Tea Tree Oil), το αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis* (άρκευθος ή αγριοκυπαρίσι) και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα).

Η ιδανική δόση χορήγησης για το κάθε αναισθητικό ήταν: για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*, (λουίζα) η ιδανική δόση βρέθηκε 200 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) η ιδανική δόση βρέθηκε 40 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*, (γαρυφαλέλαιο) η ιδανική δόση βρέθηκε 40 μl/L, (Sajan *et al.* 2012, Gladden *et al.* 2010), για το αιθέριο έλαιο του

φυτού *Juniperus communis* (άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι) η ιδανική δόση βρέθηκε 900 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* (ρίγανη) η ιδανική δόση βρέθηκε 50 μl/L, για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia* (τεϊόδεντρο) η ιδανική δόση βρέθηκε 200 μl/L (Marking and Meyer 1985). Η ποσότητα της ακετόνης που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ήταν 200μl και του νερού 20μl.

2.2.1 Αιθέριο έλαιο *Eugenia aromatica*

Το γαρυφαλέλαιο λαμβάνεται από απόσταξη των λουλουδιών, μίσχων και φύλλων του φυτού *Eugenia aromatica* (Εικ.3) και περιέχει τις δραστικές ουσίες ευγενόλη και ισοευγενόλη. Είναι οικονομικό και εύκολο στη χρήση, έχει αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, θεωρείται αρκετά ασφαλής για τα ψάρια και τους ανθρώπους και δεν απαιτείται μεγάλη περίοδος αναμονής μετά τη χρήση του (Ross L.G and Ross B. 2008). Θεωρείται καλύτερο από άλλα αναισθητικά όπως κιναλδίνη, βενζοκαΐνη και τρικαΐνη, το οποίο είναι το μόνο εγκεκριμένο αναισθητικό για ψάρια στις ΗΠΑ. Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα φυτικό προϊόν, πιο φθηνό και πιο αποτελεσματικό από άλλα αναισθητικά για ψάρια. Είναι ασφαλές για τον άνθρωπο (Munday 1997). Το γαρυφαλέλαιο είναι πιο κατάλληλο για χρήση σε εμπορικές υδατοκαλλιέργειες, όπου τα αναισθητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες ποσότητες από ανειδίκευτους εργάτες. Στο εμπόριο έχει περίπου 84% ευγενόλη, αλλά μπορεί κανείς να βρει και 100% ευγενόλη. Η ευγενόλη και το γαρυφαλέλαιο είναι διαλυτά στο νερό και κυρίως στη χαμηλή θερμοκρασία.



Εικόνα 3: *Eugenia aromatica*

2.2.3 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Aloysia triphylla*

Το φυτό *Aloysia triphylla* (λουΐζα) (Εικ.4) βρίσκεται στη Ν. Αμερική ενώ στην Ευρώπη ήρθε των 17^ο αιώνα. Έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική ως θεραπευτικό της αϋπνίας και του άγχους. Πρόσφατα το αιθέριο έλαιο του φυτού αυτού έχει καθιερωθεί ως αναισθητικό για την υδρόβια ζωή, διότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Parodi *et al.* 2013).



Εικόνα 4: *Aloysia triphylla*

2.2.4 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Melaleuca alternifolia*

Ένα αιθέριο έλαιο που χρησιμοποιείται στην εναλλακτική ιατρική στην Αυστραλία είναι το αιθέριο έλαιο τεϊόδενδρου (Tea Tree Oils) (Grzegorz 2011), το οποίο έχει διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές, αναλγητικές κ.λπ. Προέρχεται από την απόσταξη σε ατμό των φύλλων και των άκρων των κλαδιών του φυτού *Melaleuca alternifolia* (Εικ. 5). Έρευνες έχουν δείξει πως έχει χρησιμοποιηθεί σαν αναισθητικό στον κυπρίνο (*Cyprinus caprio*), τηρώντας τις βασικές προϋποθέσεις ενός καλού αναισθητικού (Hajek 2011).



Εικόνα 5: *Melaleuca alternifolia*

2.2.5 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare*

Για το αιθέριο έλαιο *Origanum vulgare* (ριγανέλαιο) (Εικ.6) έχουν αναφερθεί μόνο φαρμακευτικές ιδιότητες και όχι αναισθητικές για τα ψάρια (Καραφέρης 2013).

Έχει χρησιμοποιηθεί σε πείραμα στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Aeromonas hydrophila* (Zheng *et al.*, 2009).



Εικόνα 6: *Origanum vulgare*

2.2.6 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Juniperus communis*

Για το αιθέριο έλαιο *Juniperus communis* (άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι) (Εικ.7) έχουν αναφερθεί μόνο φαρμακευτικές ιδιότητες και όχι αναισθητικές για τα ψάρια (Καραφέρης 2013). Καλύπτει το μεγαλύτερο φάσμα των ξυλωδών φυτών, σε όλο τα Βόρειο Ημισφαίριο. Συναντάται στη Βόρεια Αμερική, στην Ευρώπη, στην Βόρεια Ασία και στη Γροιλανδία (Preston *et al.*,2007). Είναι δέντρο ύψους μέχρι 15m ή θάμνος. Απαντάται σε χαμηλά υψόμετρα μέχρι 1.600m, σε όλο το εύρος εξάπλωσης του είδους. Στην Ελλάδα συναντάται κυρίως στο Λιβαδερό της Δράμας (Βουρλιώτη –Αράπη 2010).



Εικόνα 7: *Juniperus communis*

2.2.7 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum*

Η παραδοσιακή κανέλα θεωρείται μια θεραπεία για το αναπνευστικό, το πεπτικό και τις γυναικολογικές παθήσεις. *In-vitro* και *in-vivo* μελέτες από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχουν αποδείξει πολυάριθμες ευεργετικές επιδράσεις των φαρμακευτικών ιδιοτήτων της κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) (Ranasinghe *et al.*,2013). Έτσι για το αιθέριο έλαιο *Cinnamomum zeylanicum* (Εικ.8) έχουν αναφερθεί μόνο φαρμακευτικές ιδιότητες και όχι αναισθητικές για τα ψάρια



Εικόνα 8: *Cinnamomum zeylanicum*

2.3 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά, 24 δείγματα ήπατος και 24 δείγματα βραγχίων και έγιναν τρεις επαναλήψεις για το κάθε αιθέριο έλαιο από τσιπούρες μέσου βάρους 31,56gr

Επιτόπου, αμέσως μετά την θανάτωση, τα άτομα μετρήθηκαν (Εικ.9), ζυγίστηκαν (Εικ. 10) και αφαιρέθηκε το ήπαρ και τα βράγχια. Τα όργανα, άμεσα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» με θρεπτικό υλικό (Leibovitz L-15, 10% βόειο ορό-FCS και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) σε θερμοκρασία δωματίου 22°C για 10 min. Ύστερα μεταφέρθηκαν σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα HBSS και τοποθετήθηκαν πάνω στο πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο για την απομόνωση των κυττάρων. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και

μαγνησίου. Το ασβέστιο επιδρά ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού, ενώ το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγονάσης (Baksi and Frazier, 1990).



Εικόνα 9: Μέτρηση μήκους



Εικόνα 10: Μέτρηση βάρους

2.4 Απομόνωση των κυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία περιλάμβανε δύο στάδια (Baksie and Fazier, 1990, Devaux *et al.*, 1997): Στο πρώτο στάδιο, γίνεται ο καθαρισμός του ιστού με διαδοχικές πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS ελεύθερο ασβεστίου-μαγνησίου (Ca ή Mg) και στο δεύτερο στάδιο προστέθηκε η κολλαγονάση

- **Ήπαρ:** Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση του ήπατος με το HBSS. Στη συνέχεια έγιναν ενέσεις κολλαγενάσης στον ιστό. Η κολλαγενάση είναι ένζυμο που καταστρέφει τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου, το οποίο αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στους ζωικούς οργανισμούς. Μετά τη δράση της κολλαγενάσης για 15 min, το όργανο τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια. Ακολούθησε η ανάδευση του αιωρήματος για 15 min (Είκ.11). Έπειτα το ομογενοποιημένο πλέον διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάζας, τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου «Falcon» και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 5 min (Εικ.12). Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και κρατείται το pellet και προστέθηκε νέα ποσότητα HBSS. Η διαδικασία με τις πλύσεις επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές (φυγοκέντριση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά) και στο τέλος της δεύτερης πλύσης προστέθηκαν 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate buffered saline) στον σωλήνα τύπου «Falcon» με το ομογενοποιημένο διάλυμα. Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων γίνεται με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% (5μl χρωστικής σε περίπου 45 μl κυτταρικού αιωρήματος) και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

- **Βράγγια:** Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση των βραγγίων με το HBSS και στη συνέχεια πλύσεις με κολαγενάση. Μετά τη δράση της κολαγενάσης για 15 min, τα βράγγια τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια. Ακολούθησε η ανάδευση του αιωρήματος για 15 min. Έπειτα το ομογενοποιημένο πλέον διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάζας, τοποθετήθηκε σε σωλήνα Falcon και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 5 min. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και κρατείται το pellet και προστέθηκε νέα ποσότητα HBSS. Η διαδικασία με τις πλύσεις επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές (φυγοκέντριση στις 2000 στροφές για 5 λεπτά) και στο τέλος της δεύτερης πλύσης προστέθηκαν 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate buffered saline) στον σωλήνα Falcon με το ομογενοποιημένο διάλυμα. Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων γίνεται με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% (5μl χρωστικής σε περίπου 45 μl κυτταρικού αιωρήματος) και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.



Εικόνα 11: Μηχάνημα ανάδευσης



Εικόνα 12: Φυγόκεντρος

2.5 Comet assay ή ανάλυση κομητών

Είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σε αυτή τη τεχνική ένας μικρός αριθμός κυττάρων τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε NaCl. Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρησή τους και η χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Τα κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη. Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA.

Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM-Tail Moment, όπου ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό DNA στην ουρά του κομήτη και η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως μέτρο κερματισμού το DNA.

Η «ανάλυση κομητών», όπως αναφέρθηκε, είναι μια πρακτική μέθοδος για την εκτίμηση της γενοτοξικότητας, τη μελέτη επίδρασης των μηχανισμών επιδιόρθωσης ή

για την παρακολούθηση-καταγραφή πληθυσμών που εκτίθενται σε μεταλλαξιογόνες ουσίες (Rojas *et al.*, 1999). Δείγματα λαμβάνονται, προετοιμάζονται, επεξεργάζονται και αξιολογούνται πολύ εύκολα με οπτική καταμέτρηση ή με τη χρήση συστημάτων ανάλυσης εικόνας. Επιπλέον είναι μια τεχνική σχετικά φθηνή και μελέτες μπορούν να πραγματοποιηθούν με χαμηλό προϋπολογισμό. Τα δεδομένα επεξεργάζονται εύκολα και αποτελεσματικά. Μερικές φορές η ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσιάζει δυσκολίες και είναι αναγκαία η προσέγγισή με την ενδεδειγμένη στατιστική ανάλυση, που αλλάζει από περίπτωση σε περίπτωση ανάλογα με τη φύση των δεδομένων.

Μερικές φορές, ένα καθαρό αποτέλεσμα που αποτυπώνεται από την τεχνική της ανάλυσης κομητών π.χ. με την καταγραφή υψηλών τιμών TM, δε δηλώνει πάντα και έναν υψηλό γενετοξικό κίνδυνο. Πολλές έρευνες έδειξαν ότι η συγκεκριμένη τεχνική καταγράφει γενετοξικές βλάβες που οφείλονται στις ρίζες οξυγόνου, αλλά σε συγκεντρώσεις που είναι χαμηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκε ότι προκαλούν τις κυτταρογενετικές βλάβες ή μεταλλάξεις. Επίσης, μελέτες στον άνθρωπο όπου εφαρμόστηκε η τεχνική της «ανάλυσης κομητών», κατέγραψαν βλάβη στο DNA χωρίς τα άτομα να έχουν εκτεθεί σε γενετοξικούς παράγοντες. Κομήτες που προέρχονται από γενετοξικούς παράγοντες και κομήτες που προέρχονται από φυσιολογικές διεργασίες, έχουν τα ίδια μορφομετρικά χαρακτηριστικά (δεν φαίνονται μόνο ίδιοι αλλά είναι – ως αποτέλεσμα του κερματισμού του DNA) και είναι δύσκολο να διακριθούν.

2.5.1 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες βρίσκονταν σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20min πριν τη χρήση τους για να διευκολυνθεί η πήξη της αγαρόζης. Μετά την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτησή τους με τη μορφή αιωρήματος

(20μL) σε λεπτή στρώση αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Πήκτωμα αγαρόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδευση και την ομογενοποίηση του, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα 3-4 min μέχρι να γίνει διαυγές πλήρως. Αφού στέγνωσε η αντικειμενοφόρος πλάκα από την αιθανόλη, εμβαπτίστηκε στη ζεστή αγαρόζη (>60° C) για σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 sec), ώστε να επικαθήσει στην κρύα και καθαρή επιφάνεια της. Αμέσως μετά, αφαιρέθηκε από την αγαρόζη, καθαρίστηκε προσεχτικά η κάτω επιφάνειά της και τοποθετήθηκε πάνω σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Το δεύτερο διάλυμα αγαρόζης (LMP Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, για την ανάμιξή του με το κυτταρικό αιώρημα. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), 20μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80μl αγαρόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα που έφερε τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε πάγο για 15 λεπτά.. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή.

2.5.1 Λύση κυττάρων

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

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση

Μετά τη λύση των κυττάρων, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση των αλάτων και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Εικ.13), η οποία περιείχε το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (NaOH 0,075 M, EDTA 1 mM, pH>12). Πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης παρέμειναν εκεί για 15 min με σκοπό την αποπεριέλιξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση των θραυσμάτων του μονόκλωνου DNA. Ύστερα ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση 25 V και 300 mA που είχε διάρκεια 15 min. Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με διάλυμα ουδετεροποίησης (neutralization) (Tris 0,4 M, pH=7,5) για να επανέλθει το DNA σε δίκλωνη μορφή, έτσι ώστε να δράσει η φθορίζουσα χρωστική.

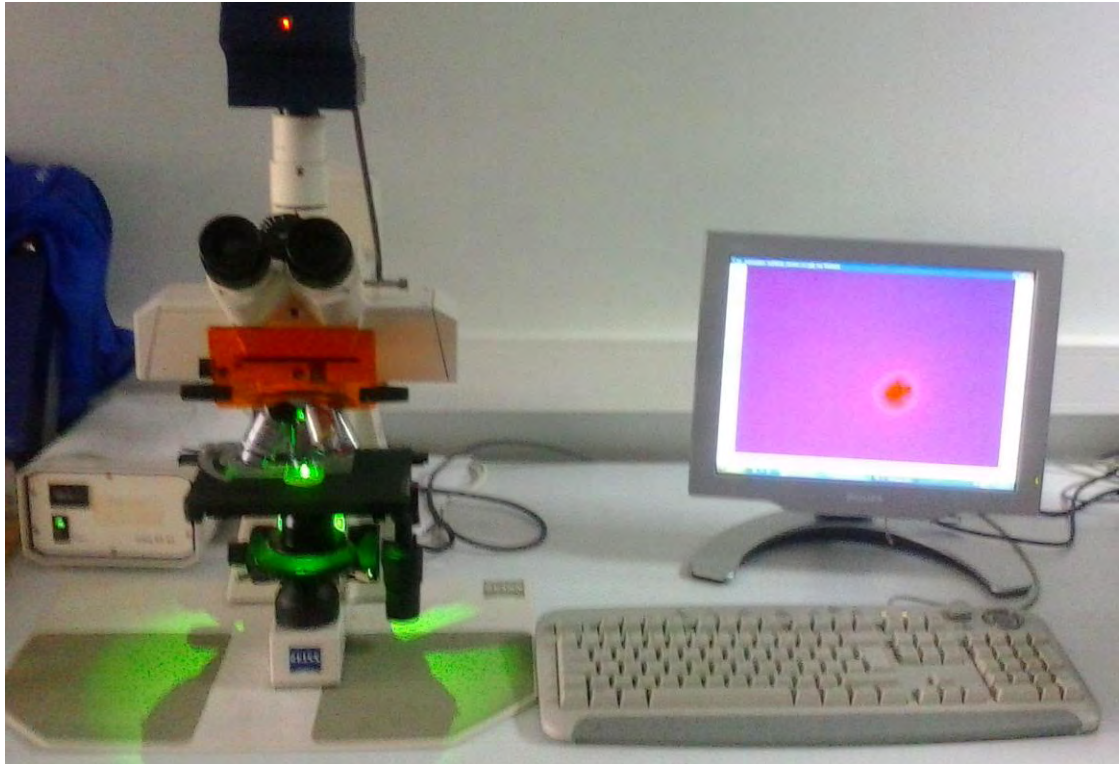


Εικόνα 13: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

2.5.3 Ανάλυση κομητών

Η χρώση του DNA έγινε με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα είναι περίπου 20 μ l. Περίπου 100 πυρήνες φωτογραφήθηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα σε μικροσκόπιο φθορισμού εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590 nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 40x (Εικ.14). Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη Η/Υ μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1, ενώ η επεξεργασία-ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP (Comet Assay Software Project).

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



Εικόνα 14: Καταγραφεί κομητών με τη βοήθεια Η/Υ.

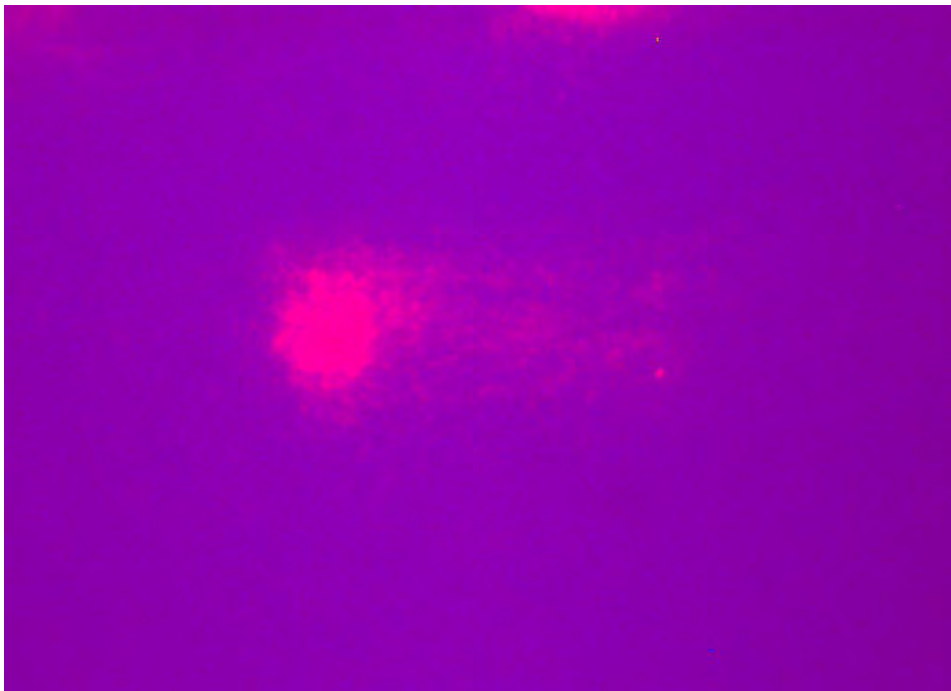
2.5.5 Εκτίμηση της βλάβης του DNA και υπολογισμός της παραμέτρου TM

Η έκταση της βλάβης του DNA ,όπως προαναφέρθηκε, εκτιμάται μετρώντας τη μετατόπιση ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου και την «ουρά», η οποία προκύπτει λόγω κερματισμού του πυρηνικού DNA (Εικ.15) και (Εικ.16).

Οι παράμετροι του κατακερματισμού του DNA, που υπολογίζονται μέσω του λογισμικού ανάλυσης εικόνας "caspr" είναι: Name, HeadArea, TailArea, HeadDNA, TailDNA, HeadDNA%, TailDNA%, HeadRadius, TailLength, CometLength, HeadMeanX, TailMeanX και Tail Moment. Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος TM – Tail Moment (το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη).



Εικόνα 15: Βραγχιοκύτταρα τσιπούρας σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση βρωμιούχο αιθιδίου (κομήτης χωρίς ουρά - ολόκληρο κύτταρο).



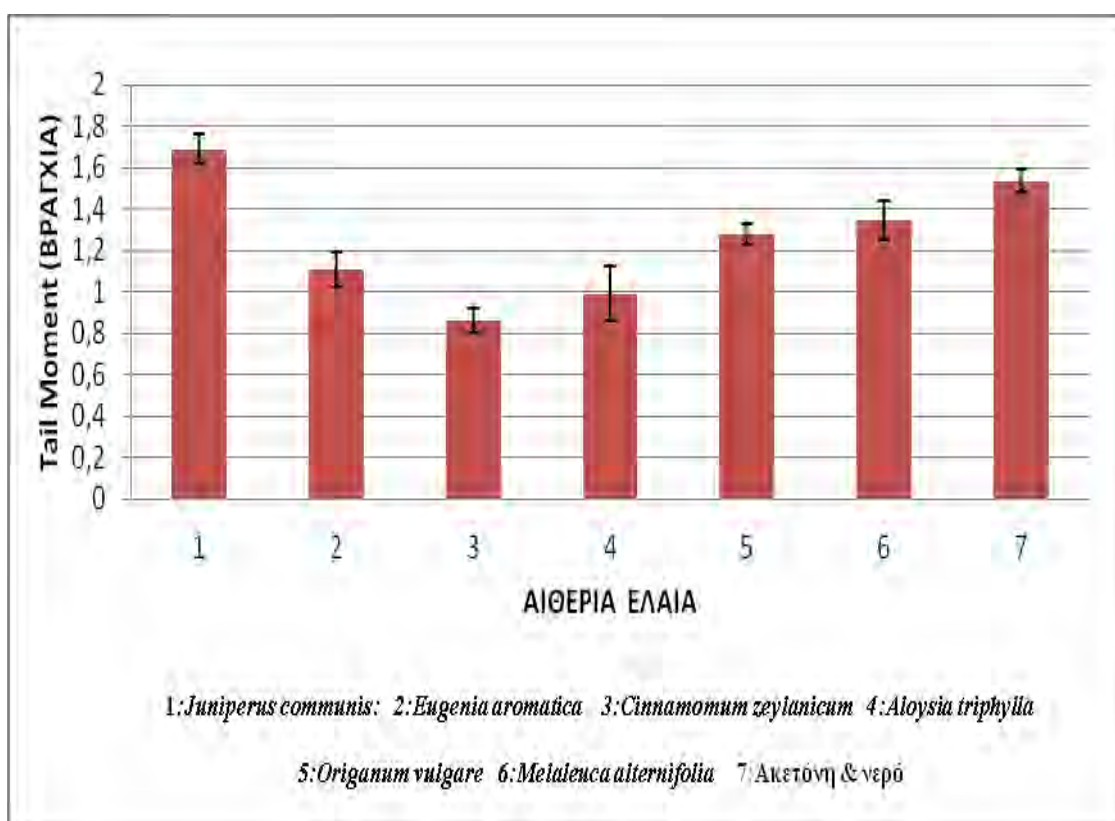
Εικόνα 16: Βραγχιοκύτταρα τσιπούρας σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από χρώση βρωμιούχο αιθιδίου (κομήτης με ουρά – κατεστραμμένο κύτταρο).

2.5.6 Στατιστική ανάλυση

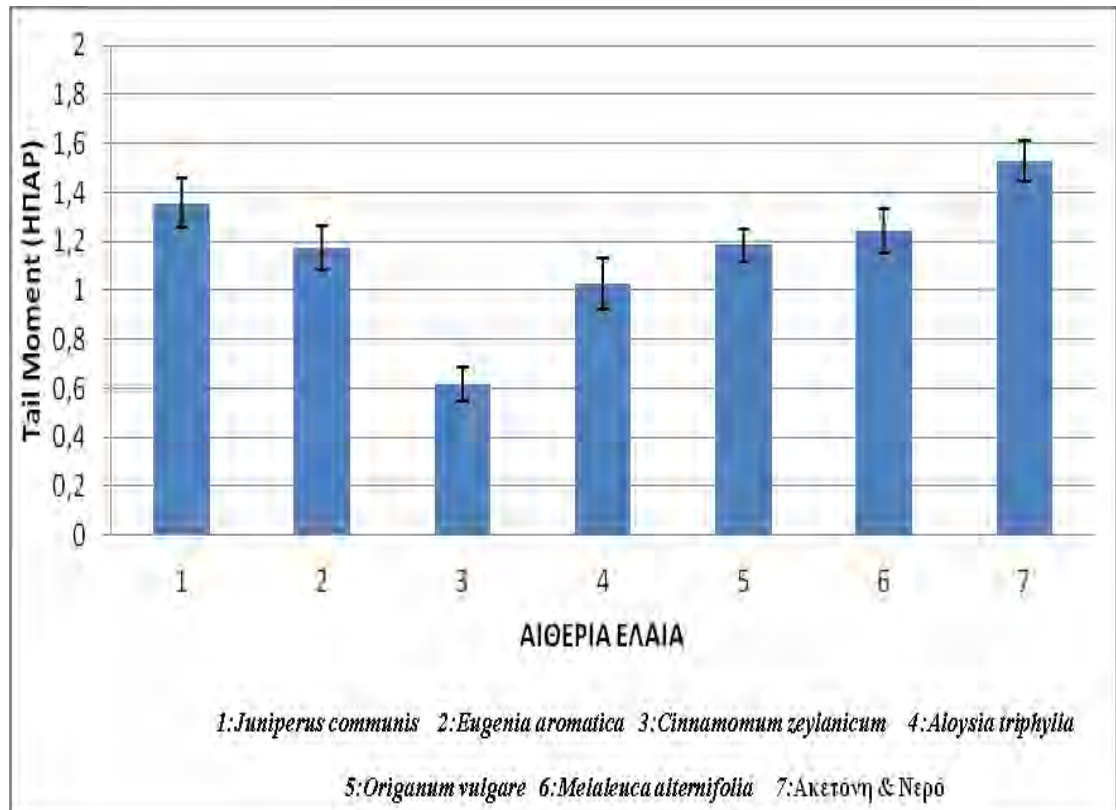
Τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα όργανα της τσιπούρας, tail moment (TM) των κομητών επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS statistics 17.0 και με το excel MS office 2007. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha = 0,05$. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ “one way Anova” και το κριτήριο Tukey HSD.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παράμετρος TM χρησιμοποιείται πιο συχνά στην τεχνική της comet assay για την εκτίμηση της βλάβης του DNA. Στο Σχήμα 1 και στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των TM που μετρήθηκαν από τα βραγχιοκύτταρα και από τα ηπατοκύτταρα των ατόμων τσιπούρας (*Sparus aurata*) μετά από έκθεση σε 6 διαφορετικά αιθέρια έλαια και σε ακετόνη με νερό.



Σχήμα 1: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση TM των βραγχιοκυττάρων μετά από έκθεση σε έξι αιθέρια έλαια και σε ακετόνη με νερό



Σχήμα 2: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση TM των ηπατοκυττάρων μετά από έκθεση σε έξι αιθέρια έλαια και σε ακετόνη με νερό.

Στο Σχήμα 1 και στο Σχήμα 2 μετά από ανάλυση των κομητών προκύπτει ότι η χρήση του αιθέριου ελαίου κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) προκαλεί μικρότερη καταστροφή του DNA των βραγχοκυττάρων και των ηπατοκυττάρων ιχθύων που μελετήθηκαν, σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια. Τη μεγαλύτερη καταπόνηση στα βραγχοκύτταρα (Σχ.1) προκάλεσε ο άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι (*Juniperus communis*), ο οποίος όμως δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τη ρίγανη και τον μάρτυρα.

Στα ηπατοκύτταρα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, η ακετόνη με το νερό προκαλεί στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη καταπόνηση συγκριτικά με τα 6 αιθέρια έλαια ($P < 0,05$).

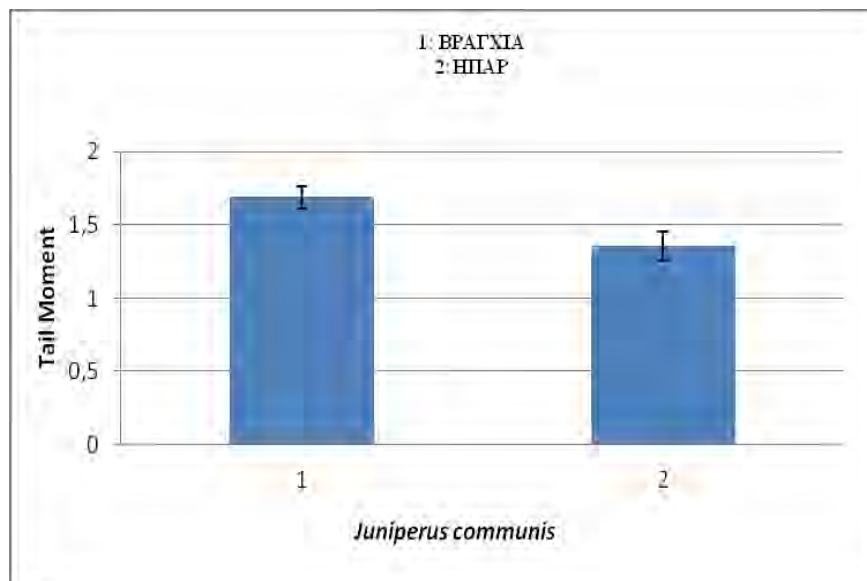
Στα κύτταρα ήπατος, αλλά και στα κύτταρα βραγχίων από κάθε δείγμα τσιπούρας, φαίνεται η τιμή TM για την κανέλα (*Cinamomum zeylanicum*) είχε το μικρότερο ποσοστό καταστροφής. Το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώνεται στατιστικά για όλα τα έλαια που εξετάστηκαν. Στη περίπτωση των βραγχιοκυττάρων, αλλά και των ηπατοκυττάρων η κανέλα διαφέρει στατιστικώς μόνο από τον μάρτυρα ($P = 0,000$).

Στα βραγχιοκύτταρα το αιθέριο έλαιο άρκευθου δε διαφέρει στατιστικώς από τη κανέλα ($P = 0,025$), τη ρίγανη ($P = 0,223$) και το μάρτυρα ($P = 0,895$). Το γαρυφαλέλαιο δε διαφέρει από τη κανέλα ($P = 0,089$), από τη λουΐζα ($P = 0,993$) και από το τεϊόδεντρο ($P = 1,000$). Τα αιθέριο έλαιο λουΐζα δε διαφέρει από το γαρυφαλέλαιο ($P = 0,993$), από τη κανέλα ($P = 0,810$), από το ριγανέλαιο ($P = 0,209$) και από το τεϊόδεντρο ($P = 0,998$). Επίσης το αιθέριο έλαιο ρίγανης δε διαφέρει από τον άρκευθο ($P = 0,223$), από τη κανέλα ($P = 0,871$) και από τη λουΐζα ($P = 0,209$). Το αιθέριο έλαιο τεϊόδεντρου δε διαφέρει από το γαρυφαλέλαιο ($P = 1,000$), από τη κανέλα ($P = 0,164$) και από τη λουΐζα ($P = 0,998$). Τέλος ο μάρτυρας δε διαφέρει μόνο από τον άρκευθο ($P = 0,895$).

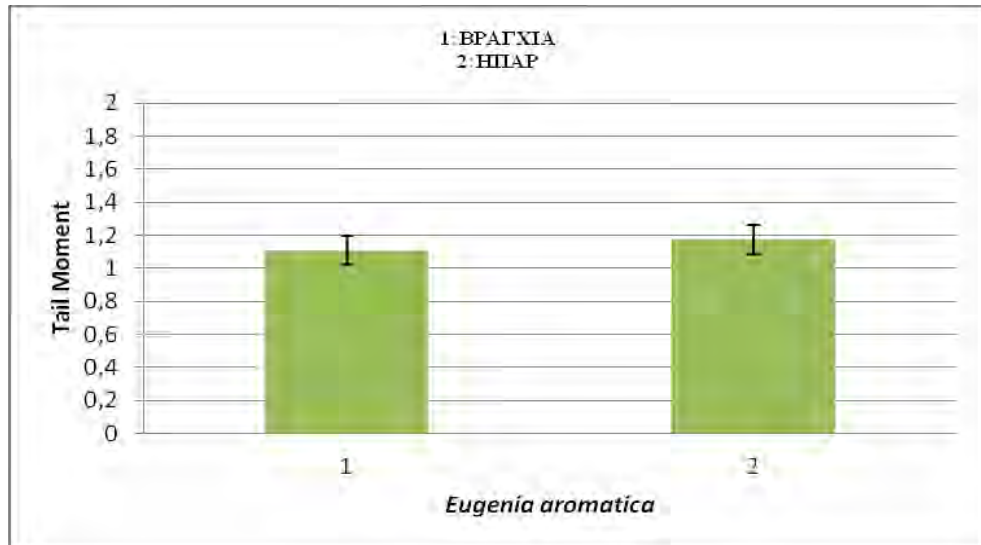
Στα ηπατοκύτταρα ο άρκευθος δε διαφέρει από το γαρυφαλέλαιο ($P = 0,992$), τη κανέλα ($P = 0,443$), τη λουΐζα ($P = 0,794$) το ριγανέλαιο ($P = 0,961$) και το τεϊόδεντρο ($P = 0,913$). Το αιθέριο έλαιο γαρυφάλου δε διαφέρει από τον άρκευθο ($P = 0,992$), τη κανέλα ($P = 0,199$), τη λουΐζα ($P = 0,992$), το ριγανέλαιο ($P = 1,000$), το αιθέριο έλαιο τεϊόδεντρου ($P = 0,612$) και τον μάρτυρα ($P = 0,072$). Η λουΐζα δε διαφέρει από τον άρκευθο ($P = 0,794$), το γαρυφαλέλαιο ($P = 0,992$), τη κανέλα ($P = 0,058$), το ριγανέλαιο ($P = 0,993$), το τεϊόδεντρο ($P = 0,245$) και τον μάρτυρα ($P = 0,567$). Το ριγανέλαιο δε

διαφέρει από τον άρκευθο ($P=0,961$), το γαριφαλέλαιο ($P=1,000$), τη κανέλα ($P=0,046$), τη λουΐζα ($P=0,993$), το τειόδεντρο ($P=0,349$) και τον μάρτυρα ($P=0,024$). Ακόμη το αιθέριο έλαιο τειόδεντρου δε διαφέρει από τη κανέλα ($P=0,969$), το γαρυφαλέλαιο ($P=0,612$), τον άρκευθο ($P=0,913$), τη λουΐζα ($P=0,245$) και το ριγανέλαιο ($P=0,349$). Τέλος ο μάρτυρας δε διαφέρει από το γαριφαλέλαιο ($P=0,072$), τη λουΐζα ($P=0,567$) και το ριγανέλαιο ($P=0,024$)

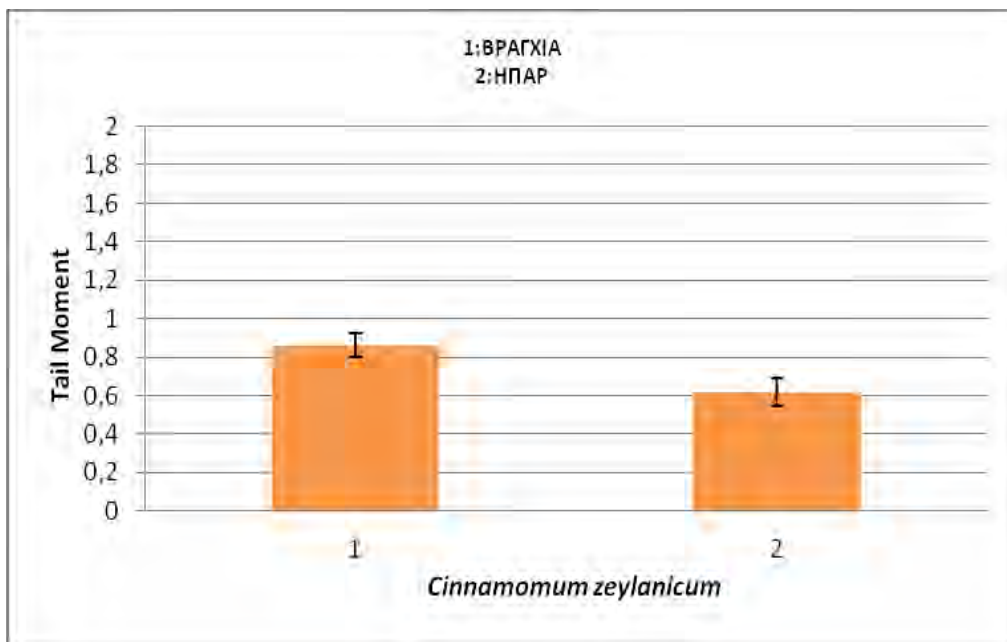
Στο Σχήμα 3, Σχήμα 4, Σχήμα 5, Σχήμα 6, Σχήμα 7, Σχήμα 8 και στο Σχήμα 9 απεικονίζονται μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των ΤΜ που μετρήθηκαν από τα βραγχιοκύτταρα και από τα ηπατοκύτταρα των ατόμων τσιπούρας (*Sparus aurata*) μετά από έκθεση σε 6 διαφορετικά αιθέρια έλαια και σε ακετόνη με νερό.



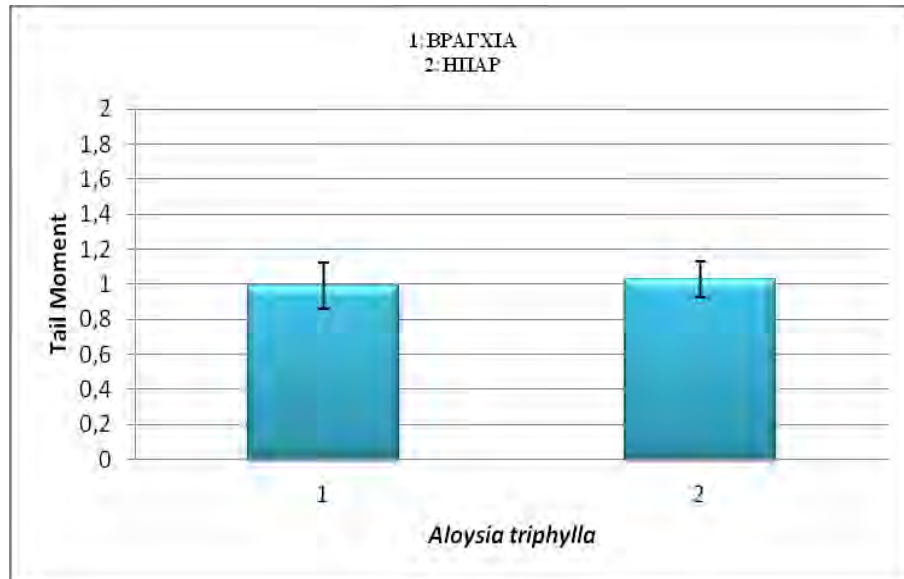
Σχήμα 3: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχιοκυττάρων μετά από έκθεση σε άρκευθο ή αγριοκυπαρίσσι (*Juniperus communis*).



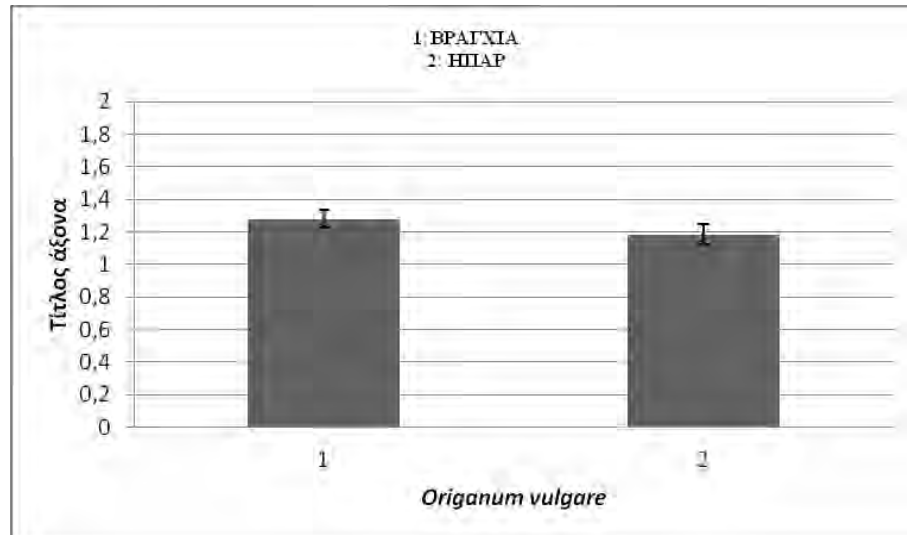
Σχήμα 4: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε γαρυφαλέλαιο (*Eugenia aromatica*).



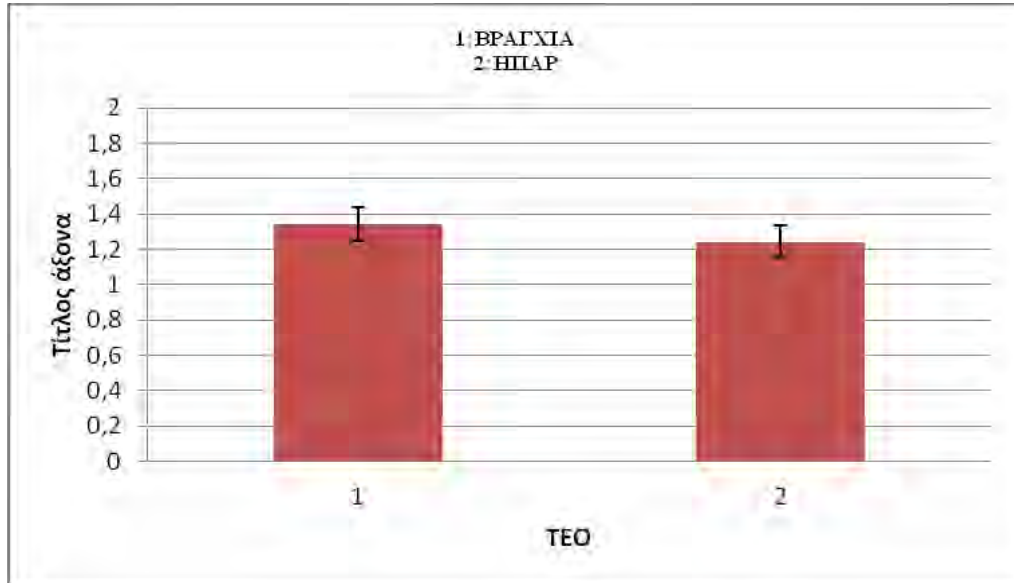
Σχήμα 5: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε κανέλα (*Cinnamomum zeylanicum*).



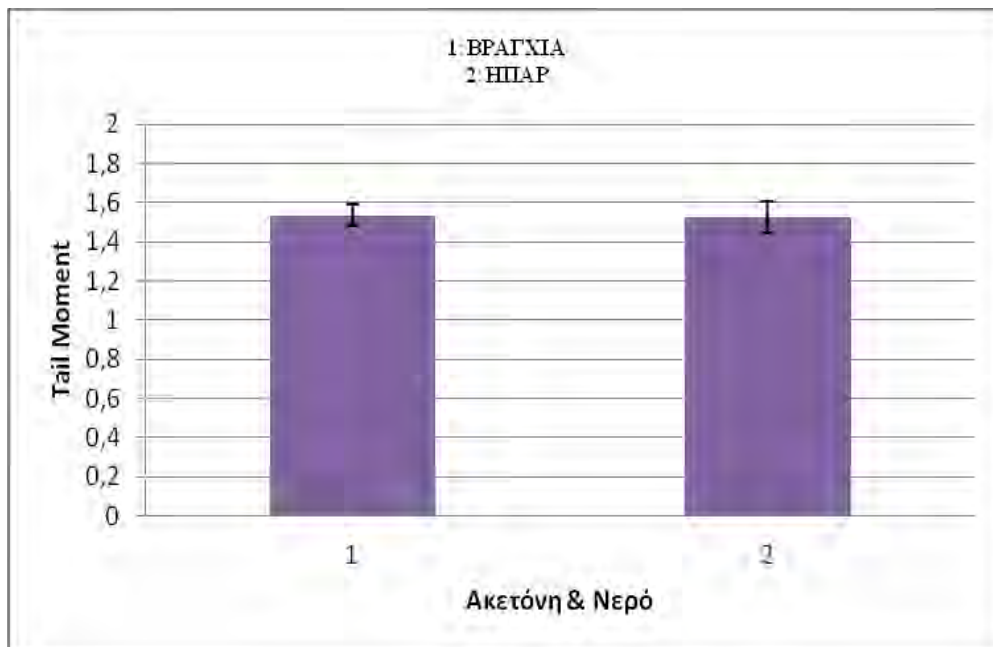
Σχήμα 6: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε λουίζα (*Aloysia triphylla*).



Σχήμα 7: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε ριγανέλαιο (*Origanum vulgare*).



Σχήμα 8: Μέσοι όροι τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε τεϊόδεντρο (*Melaleuca alternifolia*).



Σχήμα 9: Μέσοι όροι και τυπική απόκλιση ΤΜ των ηπατοκυττάρων και βραγχοκυττάρων μετά από έκθεση σε ακετόνη και νερό .

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά τα αναισθητικά (φυσικά ή χημικά) χρησιμοποιούνται για να μειωθεί η αίσθηση των οργανισμών και να πραγματοποιηθούν διάφορες διαδικασίες. Είναι μια κατάσταση που μπορεί να μειώσει την ακατπύνηση και να παραλύσει τους μυς. Τα αναισθητικά περιορίζουν το stress και βοηθούν στην ευζωία των οργανισμών που μελετούνται (Ashley 2006).

Μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως συνθετικές χημικές αναισθητικές ουσίες, ενώ από τα φυσικά αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στους υδρόβιους οργανισμούς έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και με μεγάλη επιτυχία το γαριφαλέλαιο (da Cunha 2010).

Σύμφωνα με τους Marking and Meyer, 1985, τα χαρακτηριστικά του ιδανικού αναισθητικού πρέπει να είναι: ο χρόνος δράσης < των 5 min, ο χρόνος ανάνηψης μικρός (5 min ή και λιγότερο), να μην είναι τοξικό για τα ψάρια, εύκολο στο χειρισμό και ασφαλές για το χειριστή, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς, να απεκκρίνεται και να μεταβολίζεται γρήγορα χωρίς να αφήνει κατάλοιπα, να μην έχει επιπτώσεις ή προβλήματα από την επανειλημμένη έκθεση σ' αυτό και να είναι οικονομικό και εύχρηστο (Τσαντήλας και συν., 2005).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνήθηκαν οι επιδόσεις 6 αιθέριων ελαίων, φυσικής προέλευσης, μέσα από το μέγεθος της βλάβης που υφίσταται το DNA της τσιπούρας (*Sparus aurata*), με την τεχνική comet assay ή «ανάλυση κομητών», εξαιτίας της χρήσης των συγκεκριμένων αιθέριων ελαίων. Κύριες εφαρμογές της μεθόδου είναι: 1) η μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, 2) η καταγραφή των μεταλλαξιογόνων και των καρκινογόνων ουσιών

in vivo και *in vitro* 3) ο έλεγχος της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών και 4) ο συνδυασμός των παραπάνω για την εκτίμηση του stress σε ζωντανούς οργανισμούς.

Όσον αφορά στην επίδραση του αιθέριου ελαίου στα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της διατριβής, όπως αυτή καταγράφεται με τη μέθοδο «ανάλυσης κομητών», τη μικρότερη βλάβη στο DNA υπέστησαν τα ψάρια στα οποία χρησιμοποιήθηκε το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα), συγκέντρωσης 40 μl/L στα βράγχια αλλά και στα ηπατοκύτταρα. Αντίθετα ο άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι (*Juniperus communis*), συγκέντρωσης 900 μl/L, ήταν αυτό που προκάλεσε τη μεγαλύτερη βλάβη στα βραγχιοκύτταρα, ενώ στα ηπατοκύτταρα των ιχθύων που μελετήθηκαν η ακετόνη με το νερό. Στα βραγχιοκύτταρα μετά τη κανέλα λιγότερη καταπόνηση προκάλεσε η λουίζα (*Aloysia triphylla*) και μετά το γαριφαλέλαιο (*Eugenia aromatic*). Το ίδιο συμβαίνει και στα ηπατοκύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ποσοστά γενοτοξικότητας σε όλα τα αιθέρια έλαια αλλά με διαφορετικά ποσοστά. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τη μέθοδο «ανάλυσης κομητών» αναφέρεται ότι τα αναισθητικά tricaine και benzocaine δεν επιφέρουν βλάβη στο DNA (Barreto *et al.* 2007, Miranda *et al.* 2003) όπως επίσης και για το γαρυφαλέλαιο (Χασάν και συν.,2011). Έχει αποδειχτεί πως τα αιθέρια έλαια κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) και ριγανέλαιου (*Origanum vulgare*), ως αναισθητικά σε τσιπούρες, έχουν τις λιγότερες θνησιμότητες, ενώ η περισσότερες εμφανίζονται στη χρήση του αιθέριου ελαίου λουίζα (*Aloysia triphylla*) (Καραφέρης 2013).

Οι Ostling και Johansson (1984), πρότειναν ένα μοντέλο το οποίο σε ουδέτερο περιβάλλον η δημιουργία εγκοπών (σπασίματα) στο μόριο του DNA οδηγεί στη δημιουργία θηλιών (βρόγχων) οι οποίες ξετυλίγονται κατά τη διάρκεια της

ηλεκτροφόρησης για να σχηματίσουν την ουρά του κομήτη. Η αποπεριέλιξη των θηλιών προτάθηκε επίσης ως κύρια αιτία για το σχηματισμό του κομήτη υπό αλκαλικές συνθήκες και από τον Collins *et al.*, (1997). Ο Klaude *et al.*, (1996), απέδειξε ότι η ουρά του κομήτη σε ουδέτερες συνθήκες αποτελείται από θηλιές ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον αποτελείται από θραύσματα DNA. Ένας άλλος ενδιαφέρον μηχανισμός σχηματισμού της ουράς του κομήτη προτάθηκε και από τους Singh και Stephens (1997) οι οποίοι υπέθεσαν ότι ορισμένες εγκοπές (σπασίματα) στον έναν κλώνο του DNA, αντιστοιχούσαν στην ύπαρξη συμπλόκων DNA-πρωτεϊνών. Πρότειναν λοιπόν την απομάκρυνση των εναπομεινάντων πρωτεϊνών, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της τεχνικής.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ανάγεται στη μέτρηση-εκτίμηση αυτής της σταθερής δυναμικής κατάστασης (βλάβη), υπό την επίδραση των 6 αιθέριων ελαίων, που έχουν αναφερθεί πιο πάνω, του νερού και της ακετόνης με νερό μαζί, σε ηπατοκύτταρα και κύτταρα βραγχίων που προήλθαν από ζωντανούς ιχθύες τσιπούρας (*Sparus aurata*). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι οι κομήτες που δημιουργούνται μετά από έκθεση σε μεταλλαξιγόνες ουσίες ή μετά από έντονη φυσική άσκηση, είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών επιδιόρθωσης, δηλαδή εκδηλώνονται ως αντίδραση άμυνας των οργανισμών στους γενοτοξικούς παράγοντες (Speit and Hartmann, 1995).

Ακόμη μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικοί τύποι κυττάρων αποκρίνονται με διαφορετική ευαισθησία στην έκθεση σε μολυσματικούς παράγοντες (Kim and Hyun, 2006). Το ήπαρ, είναι το κυριότερο όργανο για το μεταβολισμό των απορροφημένων ενώσεων (Hartmann and Speit, 2009). Όμως οι συμπαγείς ιστοί, όπως το ήπαρ, απαιτούν διαχωρισμό πριν την ανάλυση, με την πιθανότητα εισαγωγής βλάβης μέσω ενζυματικών ή μηχανικών διαδικασιών (Frenzilli *et al.*, 2009).

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

Από τις συγκρίσεις μεταξύ φυσικών και χημικών αναισθητικών φαίνεται σε πολλές περιπτώσεις ότι υπερτερούν τα φυσικά (Kristan, 2012). Επίσης, τα φυσικά αναισθητικά υπερτερούν και ως προς την επίδραση στην ποιότητα της σάρκας του ψαριού, είναι φτηνότερα και δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον (Cho and Heath. 2002, Iversen *et al.*, 2013).

Ακόμη, τα φυσικά αναισθητικά δεν προκαλούν ανοσοκαταστολή σε σχέση με τα χημικά (Bressler 2004), ενώ δρουν και σαν αντιοξειδωτικά των λιπιδίων Veeck, A.P.L. *et al.* (2013). Επίσης τα αναισθητικά benzocaine, 2-phenoxyethanol και quinaldine sulphate έχουν δικιμαστεί για να παρατηρηθούν οι επιδράσεις τους στο ανοσοποιητικό σύστημα της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τέσσερα αναισθητικό παράγαγαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης μετά από μία ώρα.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ότι το μικρότερο ποσοστό καταστροφής κυττάρων στα βράγχια και στο ήπαρ των ιχθύων (*Sparus aurata*) που μελετήθηκαν εμφανίστηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το αιθέριο έλαιο *Cinamomum zeylanicum* (κανέλα), συγκέντρωσης 40 μl/L, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό καταστροφής κυττάρων εμφανίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ο άρκευθος ή αγριοκυπαρίσσι (*Juniperus communis*).
- Η comet assay ή «ανάλυση κομητών» είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων.
- Τα αιθέρια έλαια βοηθούν στο να περιοριστεί το stress και στην ευζωία των οργανισμών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Anderson W.G., Mckinley R.S., Colavecchia M. (1997). The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management* (17): 301-307.

Anthony J.P, Fyfe L.and Smith H. (2005). Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *US National Library of Medicine National Institutes of Health* 21(10):462-468

Ashley, P.J. (2006). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, doi:10.1016.

Athanassopoulou, F., E. Karagouni, E. Dotsika, V. Ragias, J. Tavla and P. Christofilloyanis (2004). Efficacy and toxicity of orally administrated anticoccidian drugs for innovative treatments of *Polysporoplasma sparis* (Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1885) infection in *Sparus aurata* L. *Journal of Applied Ichthyology* 20, 345-354.

Bakkali F. (2008). Biological effects of essential oils-a review. In: *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 46 (2): 446 - 475.

Baksi S.M. and Frazier J.M. (1990). Review. Isolated fish hepatocytes- model system for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, (16):229-256.

Banerjee S., Kim L.M., Shariff M., Khatoon H. and Yusoff F.M. (2012). Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Vibrio* spp. Isolated

from Cultured Shrimp. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (2): 355-361.

Barnabe G. (1990). Rearing bass and gilthead sea bream. In: *Aquaculture* vol. 2, Ellis Horwood, London: 647-686

Baksi S.M. and Frazier J.M. (1990). Review. Isolated fish hepatocytes- model system for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, (16):229-256.

Barreto R.E., de Miranda Cabral Gontijo M.C., Alves de Lima R.O., Raymundi V.C., Pinhal D., Reyes V.A.V., Volpato G.L. and Salvadori D.M.F. (2007). MS222 does not induce primary DNA damage in fish. *Aquaculture International* (15):163–168.

Bressler K. and Ron B. (2004). Effect of anesthetics on the stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture* 56(1): 5-13.

Cho G.K. and Heath D.D. (2000). Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 31: 537-546.

Christaki E., Bonos E., Giannenas I. and Florou-Paneri P. (2012). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* (2): 228-243.

Collins A.R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* (26): 249-261.

Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M., Kennedy G., Stetinad R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375:183–193.

Cross D E, McDevitt R M, Hillman K. and Acamovic T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut

microflora in chickens from 7 to 28 days of age. In: British poultry science. 48 (4): 496-506.

da Cunha, M.A., Zeppenfeld, C.C., Garcia, L.O., Loro, V.L., da Fonseca, M.B., Emanuelli, T., Veeck, A.P.L. and Baldisserotto, B. (2010). Anesthesia of silver catfish with eugenol: Time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet [Anestesia de jundiás com eugenol: Tempo de indução, resposta ao cortisol e análise sensorial do file] *Ciencia Rural* (40):10, 2107-2114

Devaux A., Pesonens M. and Monod G. (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, (11):71-79.

Dhawan A., Bajpayee M. and Parmar D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 25: 5-32.

Dimitriou E. (2000) Results of intentional or sporadic releases of euryhaline fish species in coastal biotopes. Book of Abstracts. *Research and Technology Forum*, Zappio, pp. 49 - 54.

Düğenci S.K., Ardab N. and Candan A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 99 – 106.

ECVAM. (2002). Genotoxicity and carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim.* 30, Suppl. 1, 83-93.

Fairbairn D.W., Olive P.L. and O'Neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59.

Fishbein M. M. D., ed (1976). "Anesthesia". The New Illustrated Medical and Health Encyclopedia. 1 (Home Library Edition ed.). New York, N.Y. 10016: H. S. Stuttman Co. pp. 87.

Filiciotto, F., Buscaino, G., Buffa, G., Bellante, A., Maccarrone, V., Mazzola, S. (2012). Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effect on some haematological parameters in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances* **11**:4, 494-502.

Frenzilli G., Nigro M. and Lyons B.P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681: 80-92.

Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. and Sakagami H. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* **177**(1): 39-54.

Fu Y.W., Zhang Q.Z., Xu D.-H., Xia H., Cai X.X., Wang B. and Liang J. (2014). Parasitocidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. *Diseases of Aquatic Organisms*, **108** (2): 129 – 136.

Gladden, J.N., Brainard, B.M., Shelton, J.L., Camus, A.C. and Divers, S.J. (2010). Evaluation of isoeugenol for anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*) *American Journal of Veterinary Research* **71** (8):859-866.

Grzegorz J.H. (2011). The anaesthetic-like effect of tea tree oil in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, **42**: 296 – 300.

Hajek A. (2011). Changes in blood biochemistry of common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus), following exposure to different concentrations of clove solution. *Comparative Clinical Pathology*, Article in Press pp. 1-5.

Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2011a) Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunol.* **30**: 128–134.

Harpaz S., Glatman L., Drabkin V. and Gelman A. (2003). Effects of Herbal Essential Oils Used To Extend the Shelf Life of Freshwater-Reared Asian Sea Bass Fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66 (3): 410–417.

Hartmann A. and Speit G. (2009). Comet Assay - Protocols and Testing Strategies. In: *The Comet Assay in Toxicology* (eds Dhawan A. & Anderson D.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 377-378.

Immanuel G R, Uma P., Iyapparaj P., Citarasu T., Punitha Peter S.M., Michael M. Babu, and A Palavesam (2009). Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. In: *Journal of fish biology*. 74 (7): 1462-1475.

Immanuel G., Vincybai V.C., Sivaram V., Palavesam L. and Marian M.P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus juveniles*. *Aquaculture*, 236, (1-4), 53 - 65.

Iversen, M.H., Økland, F., Thorstad, E.B., Finstad, B. (2013). The efficacy of Aquisvet. (iso-eugenol) and metomidate as anaesthetics in European eel (*Anguilla anguilla* L.), and their effects on animal welfare and primary and secondary stress responses. *Aquaculture Research*, 44:1307-1316.

Iwama G.K, Pickering A.D., Sumpter J.P.and Schreck C.B. (1997). Fish stress and health in aquaculture. *Cambridge University Press*, UK. pp 278.

Jang I. (2007): Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens“. In: *Animal Feed Science and Technology*. 134 (3-4): 304-315.

Karagouni E., Athanassopoulou F., Lytra A., Komis C. and Dotsika E. (2005). Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. 134(3-4): 215–228.

Kim M.C., Kim M.J., Kim J.S., Heo M.S. (2007) Effect of culture broth from mushroom mycelium on growth and nonspecific immune parameters in flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration. *Korean J Life Sci.* 17: 1434–1440.

Kim I.Y. and Hyun C. K. (2006). Comparative evaluation of the alkaline Comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 288-297.

Kim J.; Marshall, Maurice R.; Wei, Cheng-i (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43 (11): pp. 2839-2845.

Klaude M., Ericson S., Nygren J. and Ahnström G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations *Mutation Research*, 363: 89-96.

Kristan, J., Stara, A., Turek, J., Policar, T., Velisek, J. (2012). Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) *Neuroendocrinology Letters* 33 (SUPPL. 3) , pp. 66-71.

Lawrence J.N., Foster B. and Benford D.J. (1991). The application of a wedge perfusion technique to the in vivo-in vitro rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutation Research*, 252:129-137.

Lewin, B. (2004). Recombination and repair. In: *Genes VIII*. 1st ed., Pearson Prentice Hall, New Jersey: 419-462.

Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V. and Dusinska M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. (3): 233-278.

Mahmoud, Barakat S.M et al. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds“. In: Food Microbiology. 21 (6): pp. 657-666.

Marking, L.L. and Meyer, F.P. (1985). Are Better Anesthetics Needed in Fisheries? Fisheries, (10): 6

Maura A., Pino A. and Ricci R. (1989). Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. *Mutation Research* 227: 125-129.

Maurici D., Aardema M. and Corvi R., (2005). Genotoxicity and mutagenicity. *Altern. Lab. Anim.*33, Suppl. 1, 117-130.

Mejlholm O and Dalgaard, P (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and ® sh products. In: Letters in Applied Microbiology, pp. 27-31.

Mitchell, M.A. (2009). Anesthetic Considerations for Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* (18):1, 40-49.

Miranda Cabral Gontijo Álisson Marques de, Rodrigo Egydio Barreto, Günter Speit, Victor Alexis Valenzuela Reyes , Gilson Luiz Volpato Daisy Maria Favero Salvadori (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research* 534: 165–172.

Moon, T., Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M.A. (2006). Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *School of Biomedical Sciences* 99(6):722-728.

Muhl A. and Liebert F (2007). Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phytogenic feed additive. In: *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 91 (9-10): 411-418.

Munday, P.L., Wilson, S.K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboicensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, (51):5, 931-938.

Mylonas C.C., Cardinaletti G., Sigelaki I. and Polzonetti-Magni A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, (246):1-4, 467-481.

Ostling O., Johanson KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, 123:291-298.

Oriakpono O., Aduabobo H., Grace D. B Awi-Waadu and Nzeako S. (2012). Anti-Parasitic Effects of Methanolic Extracts of *Artemisia annua* L. against Parasites of *Sarotherodon melanos* on *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 1(2):108-116.

Parodi V. T. Cunha M. A., Becker A. G., Zeppenfeld C.C., Martins D.I., Barcellos G. L. L. and Heinzmann B. M. (2013). Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* DOI 10.1007/s10695-013-9845-z.

Peng, Y., Wu, Y., Li, X., Li, Q., Liu, Z., Jiang, B., Liu, Y., Zhang, Y. (2011). Experimental study on anesthetic effects of eugenol on *Carassius auratus* ICEOE International Conference on Electronics and Optoelectronics, Proceedings 1, art.no. 6013116, pp. V1343-V1346.

Phillips D.H. (1990). Further evidence that eugenol does not bind to DNA in vivo. *Mutation Research* **243**: 23-26.

Preston S.J., Wilson C., Jennings S., Provan J. and McDonald R.A. (2007). The status of juniper *Juniperus communis* L. in Northern Ireland in 2005. *28(9)*:372.

Pyrgotou N. (2010). Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. In: *Journal of food science*. *75(7)*: 406-411.

Ranasinghe P., Pigera S., Premakumara GA Sirimal, Priyadarshani Galappaththy Godwin R Constantine and Prasad Katulanda (2013). Godwin R Constantine³ and Prasad Katulanda Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *Ranasinghe et al. BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**:275.

Rao V. Y. and Chakrabarti R. (2005). Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feeding ingredients. *Fish and Selfish Immunology* (**18**): 327-334.

Rojas E., Valverde M., Sordo M., Ostrosky-Wegman P. (1996). DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, **370**:115-120.

Romero J., Feijó C.G. and Navarrete P. (2000) Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. *Health and Environment in Aquaculture*, pp.175, 178-181.

Ross L.G. and Ross B. (2008). Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals - 3rd Edition. Blackwell Publishing Ltd., pp. 7, 79-81, 83-84.

Ross L.G. and Ross B. (1999). Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Institute of Aquaculture, University of Stirling*. (58): 145-155.

Sajan, S., Malika, V. and Anna Mercy, T.V. (2012) Use of an eco-friendly anaesthetic in the handling of *Puntius denisonii* (Day, 1865)- An endemic ornamental barb of the Western Ghats of India. *Indian Journal of Fisheries* 59 (3):131-135.

Shan X.-F., Meng Q.-F., Kang Y.-H., Bian Y., Gao Y.-H., Wang W.-L. and Qian, A.-D. (2014). Isolation of active compounds from methanol extracts of *Toddalia asiatica* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Parasitology*, 199 (3-4): 250 – 254.

Singh N.P. and Stephens R.E. (1997). Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanism, and DNA electrostretching. *Mutation Research*, 383:167-175.

Sivarama V., M.M. Babua, G. Immanuela, S. Murugadassa, T. Citarasub, M.P. Marian (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections *Aquaculture* (237): 9 – 20.

Sola L., Moretti A., Crosetti D., Karaïskou N., Magoulas A., Rossi A.R., Rye M., Triantafyllidis A. and Tsigenopoulos C.S. (2006) Gilthead seabream - *Sparus aurata*. In: “Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations.” D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. Viterbo, Italy, pp. 6.

Solimana K. M. and Badeaa R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1669 - 1675.

Speit, G. and Hartmann, A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555–559.

.Sudhakaran D. S., Sirekha P., Premsingh S. and Michael R. D. (2006). Immunostimulatory effect of *Tinospora cordifolia* Miers leaf extract in *Oreochromis mossambicus*. *Indian journal of experimental biological*, 44(9), 726-732.

Summer felt R.C. and Smith L.S. (1990). Anaesthesia, Surgery and related techniques. In: C. B. Scherelk and P.B. Moyle (ed) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 213-272.

Thompson D.C., Barhoumi R. and Burghardt R.C. (1998). Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology* 149(1): 55-63.

United Nations Economic Commission for Europe (UNECE). (2004). Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals (GHS). Part 3. Health and environmental hazards. Chapter 3.5. Germ cell mutagenicity

Veeck, A.P.L., Klein, B., Ferreira, L.F., Becker, A.G., Heldwein, C.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., Emanuelli, T. (2013). Lipid stability during the frozen storage of fillets from silver catfish exposed in vivo to the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (4): 955-960

Wagner E., Arndt R. and Hilton B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility of rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture* 211: 353-366.

Yeh R.Y., YaLi, ShuChiu S.; ShengChi C.; Huang SungYan; Lin Jiunn Cheng; and Chun Hung L. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In: Fish and Shellfish Immunology, 27 (1): 26-32.

Zheng Z.L. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). In: Aquaculture. Elsevier B.V. 292 (3-4): 214-218.

Ελληνική βιβλιογραφία

Βουρλιώτη –Αράπη Φιλιώ (2010). Μελέτη των αιθέριων ελαίων του γένους *Juniperus* της ελληνικής γλωρίδας: χημική σύσταση και βιοδραστικότητα. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ. 12.

Καραφέρης Ι. (2013). Ουσίες φυσικής προέλευσης με αναισθητικές ιδιότητες. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 15.

Μαλανδράκης Ε. (2011). Η γενετοξικότητα των βαρέων μετάλλων στους υδρόβιους οργανισμούς. Πρακτικά 4^{ου} Διεθνές Συνεδρίου «Υδροβιολογίας - Αλιείας», Βόλος.

Μυρωνίδου-Τζουβελέκη, Μ., Καλούσης, Κ., Χριστοπούλου-Αλετρά, Ε. (2009). Η Αναλγητική Αγωγή από την Ομηρική στην Ιπποκρατική Ιατρική. *Archives of Hellenic Medicine*, (26):124-129.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 846 – 863.

Τσαντήλας Η., Γαλάτος Α.Δ., Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. *Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας*, 56:130-137

Χασάν Ε., Μαλανδράκης Μ., Μαρτσικάλης Π., Γκολομάζου Ε., Εξαδάκτυλος Α., Νεοφύτου Χ., Παναγιωτάκη Π. (2011) Επίδραση της αναισθησίας στην καταπόνηση της τσιπούρας (*Sparus aurata* L. 1758). Πρακτικά 3ου Διεθνούς Συνεδρίου Υδροβιολογίας – Αλιείας. Βόλος.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

[http¹://www.wisegeek.com/what-is-genotoxicity.htm](http://www.wisegeek.com/what-is-genotoxicity.htm) (08/04/2014)

FAO (2006). FishStat. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>

FAO (2013), Food and Agriculture Organization of the United Nations,

<http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/gilthead-seabream/faqs/en/>

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en

7. ABSTRACT

Essential oils are volatile liquids which contain the substances responsible for the scents of plants, which have been produced by different organs, eg flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits and roots and there are various methods for extracting them.

The genotoxicity is a property possessed by some substances makes them harmful for the genetic information contained in organizations.

The sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) is a very important commercial species in Europe, the intensive rearing of recent years has increased greatly. Moreover, the burden of coastal areas and seas with heavy metals due to growing urban and industrial activities and intensive agricultural cultivation using pesticides and fertilizers, has a direct impact on the aquatic ecosystem.

In the present study a part of the cells of the liver and gill cells isolated from sea breams examined directly for assessing the genotoxicity of essential oils, (*in vitro* assessment), verbena (*Aloysia triphylla*), clove (*Eugenia aromatica*), oregano (*Origanum vulgare*), tea tree ~ Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*), juniper (*Juniperus communis*) and the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), as well as water, with acetone together with the comet assay.

The results showed DNA damage in all essential oils but with different percentages. The smallest percentage of cell damage in the gills and liver of the fish studied appeared when used essential oil *Cinamomum zeylanicum*, the highest percentage destruction was the *Juniperus communis*. The results showed that the comet

assay is a practical technique that can be used to for the estimation of the risk of genotoxic essential oils.

Keywords: analysis of comets, comet assay, essential oils, genotoxicity, sea bream.