



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ »

**Η Επίδραση των Εκχυλισμάτων από τα
Φυτά *Campanula versicolor* και *Lunaria annua* στον
πολλαπλασιασμό και στην βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων
νευρικής προέλευσης**

ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΦΟΥΚΑ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

**The Effect of Extracts from *Campanula versicolor* and *Lunaria annua*
plants on the proliferation and viability of cancer cells of neural
origin**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2022-2023. Η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους.

Πρώτα και κύρια, εκφράζω την ειλικρινή μου εκτίμηση στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη και στον κ. Γεώργιο Κ. Παπαδόπουλο. Η επιστημονική καθοδήγηση και η ενεργή συμμετοχή τους σε όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης ήταν ανεκτίμητες.

Είμαι επίσης βαθιά ευγνώμων στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Γεώργιο Πατακιούτα και την κ. Παρασκευή Μπέζα, για τον χρόνο και τον κόπο τους στην ανασκόπηση της εργασίας μου. Τα πολύτιμα σχόλια και η εποικοδομητική κριτική τους βελτίωσαν σημαντικά την ποιότητα της διατριβής μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου, όπως η Σοφία Λουκμακιά, ο Ιωάννης Τσίγκας, η Ελευθερία Σαράφη, η Κωνσταντίνα Καρυδάκη, η Ματίνα Σαρητζόγλου, η Δέσποινα Βούλγαρη, η Βασιλική Αντωνίου, και η Θεόλη Τζίλια. Η υπέροχη συνεργασία και η υποστήριξή σας έκαναν την ερευνητική διαδικασία ευχάριστη και εμπλουτισμένη. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην Δέσποινα Μαρή με την οποία μοιράστηκα αυτό το ταξίδι και απέκτησα ανεκτίμητη γνώση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
ΜΕΡΟΣ 1	14
1.1 Χρήση φαρμακευτικών φυτών	14
1.2 Απομόνωση δραστικών ουσιών από τα φυτά	17
1.3 Μορφολογία άνθους	22
1.4 Το χρώμα των ανθέων	23
1.5 Φλαβονοειδή	24
1.5.1 Φλαβόνες	27
1.5.2 Φλαβονόλες	28
1.5.3 Χαλκόνες	29
1.5.4 Αουρόνες	30
1.5.5 Φλαβανόνες	31
1.5.6 Ισοφλαβονοειδή	31
1.5.7 Διφλαβονοειδή	31
1.5.8 Ξανθόνη	32
1.6 Ανθοκυανίνες	33
1.6.1 Χρώμα ανθοκυανινών	39
1.6.1.1 Υγρασία	39
1.6.1.2 Σάκχαρα	39
1.6.1.3 Θερμοκρασία	40
1.6.1.4 pH	41
1.6.1.5 Συν – χρωματισμός	42
1.6.1.6 Οξυγόνο	45
1.6.1.7 Ασκορβικό οξύ	45
1.6.1.8 Φως	46
1.6.1.9 θειώδη και θειικά άλατα	46
1.6.1.10 Ένζυμα	46
1.6.2 Ανθοκυανιδίνες	48
ΜΕΡΟΣ 2	50
2.1 <i>Lunaria annua</i>	50
2.2 <i>Campanula versicolor</i>	52

ΜΕΡΟΣ 3	55
3.1 Be2C	55
3.1.1 Νευροβλάστωμα	56
3.1.2 Συμπτώματα	57
3.1.3 Αιτιολογία	58
3.1.4 Παθογένεση	59
3.1.5 Αντιμετώπιση - Θεραπεία	60
ΜΕΡΟΣ 4	61
4.1 6-Υδροξυντοπαμίνη (6-OHDA)	61
4.2 Ροτενόνη (Rotenone)	63
ΜΕΡΟΣ 5	64
5.1. Ki67	64
5.2. Ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (Ac - tubulin)	66
2. ΣΚΟΠΟΣ	66
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	67
3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ	67
3.1.1 Εκχύλιση πετάλων	67
3.1.2 Διαλύτες εκχύλισης	67
3.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων	68
3.1.4 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων με την χρήση Θρυψίνης (Κυτταρικό Split)	69
3.1.5 Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer	69
3.1.6 Απόψυξη κυττάρων	70
3.1.7 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών	70
3.1.8 Καλλιέργεια των κυττάρων σε μικροφρεάτια με προσθήκη των εκχυλισμάτων	71
3.1.9 Παρασκευή της 6-υδροξυντοπαμίνης	71
3.1.10 Παρασκευή της Ροτενόνης	71
3.1.11 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD	72
3.1.12 Λυοφιλοποίηση	74
3.1.13 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)	74
3.1.14 Ηλεκτροφόρηση των Δειγμάτων σε Πηκτή SDS – Πολυακρυλαμίδιο	75
3.1.15 Μεταφορά των Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης	76
3.1.16 Επώαση της Μembrάνης με Ειδικά Αντισώματα και Ανίχνευση των Πρωτεϊνών	77
3.1.17 Ανοσοκυτταροχημεία	78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	79
ΜΕΡΟΣ 1: Προσθήκη τοξινών που δυσχεραίνουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων στη νευροβλαστωματική σειρά και ICC	79

Προσθήκη 6-OHDA και Ροτενόνης στη κυτταρική σειρά Be2c	79
ΜΕΡΟΣ 2: Προσθήκη εκχυλίσμάτων στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και ICC	83
Προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> στη κυτταρική σειρά Be2c	83
Προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> στη κυτταρική σειρά Be2c	86
ΜΕΡΟΣ 3 : Χρήση των τοξινών 6-OHDA και Ροτενόνης ως παραγόντων στρες και μελέτη των επιπτώσεων τους στη κυτταρική σειρά Be2c [RESCUE – Απομάκρυνση (A)]	99
ΜΕΡΟΣ 4: Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή πολυακρυλαμίδιου με SDS	104
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη, αναλύονται οι πιθανές επιδράσεις των φυτικών εκχυλισμάτων από *Campanula versicolor* και *Lunaria annua* στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων νευρικής προέλευσης (νευροβλαστωματικές σειρές), καθώς και την απόκρισή τους σε παράγοντες που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και δυσχεραίνουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία.

Από την αρχαιότητα, τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας χρόνιων και μολυσματικών ασθενειών και την πρόληψη της εμφάνισης διαφόρων διαταραχών. Πολλά φυτά, συμπεριλαμβανομένων αυτών που επιλέχθηκαν για αυτή τη μελέτη, έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα πιθανά θεραπευτικά τους οφέλη.

Συγκεκριμένα, η *Lunaria annua* και η *Campanula versicolor* περιέχουν ανθοκυανίνες, οι οποίες δίνουν στα άνθη τους το χαρακτηριστικό μωβ χρώμα. Οι ανθοκυανίνες είναι μια κατηγορία υδατοδιαλυτών φλαβονοειδών, τα οποία παρουσιάζουν μια σειρά φαρμακολογικών επιδράσεων, όπως η πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, ο έλεγχος της παχυσαρκίας και η αντικαρκινική δράση. Οι πιθανές αντικαρκινικές επιδράσεις τους αναφέρεται ότι βασίζονται σε μια ευρεία ποικιλία βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, και αντι-μεταλλαξιογόνων δράσεων, καθώς επίσης και στην επαγωγή της διαφοροποίησης και την αναστολή του πολλαπλασιασμού. Οι δράσεις αυτές φαίνεται ότι οφείλονται στην ικανότητά τους να παρεμβαίνουν σε σημαντικές πορείας μεταγωγής σήματος, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου και διεγείροντας την απόπτωση ή την αυτοφαγία των καρκινικών κυττάρων, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία τους στη χημειοθεραπεία.

Στα πλαίσια της μελέτης μας λοιπόν, αρχικά, απομονώσαμε εκχυλίσματα από τα πέταλα αυτών των φυτών, με τη μέθοδο της εκχύλισης παρουσία υδατικού διαλύτη. Η δράση τους μελετήθηκε σε καλλιέργειες νευρικών καρκινικών κυττάρων της ανθρώπινης νευροβλαστωματικής σειράς **Be2C**. Επιπλέον, επειδή τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια έχουν συνδεθεί με διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η ανάλυση των επιδράσεων των φυτικών εκχυλισμάτων στη μιτοχονδριακή λειτουργία στα νευρικά κύτταρα μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα πιθανά θεραπευτικά τους οφέλη για αυτές τις διαταραχές. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν οι τοξίνες 6-Υδροξυντοπαμίνη (**6-OHDA**, 6-hydroxydopamine) και η ισοφλαβόνη Ροτενόνη (**Rotenone**) επειδή δυσχεραίνουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων και χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για την μελέτη του καρκίνου, αλλά και νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος του Parkinson. Οι ουσίες αυτές δυσχεραίνουν την μεταφορά των ηλεκτρονίων και την παραγωγή ATP και προκαλούν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα.

Αρχικά μελετήσαμε τις συνέπειες του συνδυασμού εκχυλισμάτων από τα φυτά *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* στον πληθυσμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα στον αριθμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων

ελέγξαμε στην συνέχεια την επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό και την μορφολογία των κυττάρων μέσω ανοσοκυτταροχημείας (ICC, immunocytochemistry) και μικροσκοπίας φθορισμού, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα κατά **Ki67** που είναι ένας δείκτης πολλαπλασιασμού, που τα επίπεδά του αυξάνονται σταθερά από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου μέχρι και τη μίτωση, καθώς και ένα αντίσωμα έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (**Ac-tubulin**) που αντανάκλα την ακεραιότητα κυτταρικού σκελετού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε προσθήκη των υδατικών φυτικών εκχυλισμάτων μετά την επίδραση των τοξινών 6-OHDA και Rotenone στα κύτταρα αυτά, προκειμένου να διερευνήσουμε αν έχουν προστατευτική ή συνεργατική δράση.

Τέλος, αξιοποιήσαμε τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιο, και χρώσης με διάλυμα *Coomassie Brilliant Blue* για να ελέγξουμε την πιθανή παρουσία πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα. Πράγματι, διαπιστώσαμε την παρουσία ζωνών οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες διαφόρων μοριακών βαρών στα εκχυλίσματα των φυτών, κάποιες από τις οποίες ενδεχομένως να έχουν συμβάλει στις επιδράσεις που παρατηρήσαμε στη λειτουργία των κυττάρων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την ανάλυση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από τα πέταλα των παραπάνω φυτών έδειξαν υψηλή κυτταροτοξική δράση έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος. Η περαιτέρω μελέτη των ευρημάτων μας μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόησή μας για τα πιθανά θεραπευτικά οφέλη τέτοιων εκχυλισμάτων στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των καρκινικών νευρικών κυττάρων, καθώς και τη μιτοχονδριακή τους λειτουργία, και θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών, βασισμένων στα φαρμακευτικά φυτά για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, αλλά και του καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: *Campanula versicolor*, *Lunaria annua*, νευροβλαστωματικά καρκινικά κύτταρα Be2c, οξειδωτικό στρες, εκχυλίσματα ανθέων

ABSTRACT

In the present study, we analyzed the potential effects of plant extracts from flower buds of *Campanula versicolor* and *Lunaria annua* on the proliferation and viability of cancer cells of neural origin (neuroblastoma lines), as well as their response to factors that increase oxidative stress and impair mitochondrial function.

Since ancient times, medicinal plants have been used for various purposes, including the treatment of chronic and infectious diseases and the prevention of various disorders. Many plants, including those selected for this study, have strong antioxidant properties, which may play an important role in their potential therapeutic benefits.

Specifically, *Lunaria annua* and *Campanula versicolor* contain anthocyanins, which give their flowers their characteristic purple color. Anthocyanins are a class of water-soluble flavonoids, which exhibit a range of pharmacological effects, such as cardiovascular disease prevention, obesity control, and anticancer activity. Their potential anticancer effects are reported to be based on a wide variety of biological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and anti-mutagenic activities, as well as differentiation-inducing effects, and inhibitory effects on proliferation. These actions appear to derive from their ability to interfere with important signal transduction pathways, causing cell cycle arrest and stimulating apoptosis or autophagy, thus increasing cancer cell sensitivity to chemotherapy.

Thus, in our study, we isolated extracts from the petals of these plants, using aqueous solvent extraction methods, and initially tested their effects in tumor cells of neural origin, namely in the human neuroblastoma cell line Be2C. Moreover, since dysfunctional mitochondria have been linked to various neurodegenerative diseases, the analysis of plant extracts on the mitochondrial function of neuronal cells may provide important insights into their potential therapeutic benefits for such disorders. For this purpose, we chose the neurotoxin 6-OHDA (6-hydroxydopamine) and the isoflavone Rotenone, because they can impair the function of mitochondria and are widely used as models for the study of cancer, but also for neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease. These substances hinder the transport of electrons and the production of ATP, thereby causing oxidative stress in the cells.

We first studied the effects of combining extracts from the plants *Lunaria annua* and *Campanula versicolor* on the neuroblastoma cell population. Based on the results on cell number and viability we then examined their effects on cell proliferation and morphology by immunocytochemistry (ICC) and fluorescence microscopy. For this purpose, we used antibodies against the proliferation marker Ki67, the levels of which increase from the G1 phase of the cell cycle to mitosis, as well as an antibody against the acetylated tubulin (Ac-tubulin) to monitor potential changes in the organization of the cytoskeleton. We also added various amounts of these aqueous plant extracts in the cells after the addition of the toxins 6-OHDA and Rotenone to these cells, in order to investigate whether they have a protective or synergistic effect

Finally, we used sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in combination with Coomassie Brilliant Blue staining to check for the

possible presence of proteins in the extracts. Indeed, we found several bands corresponding to proteins of various molecular weights, some of which may have contributed to the observed effects in our cells.

In conclusion, the results from the above analysis showed a significant cytotoxic effect of the extracts from the petals of both *Lunaria annua* and *Campanula versicolor* on the human neuroblastoma cancer cell line Be2C. Further examination of these findings in future studies may contribute to a better understanding of the potential therapeutic benefits of such extracts on the proliferation and viability of neural cancer cells, as well as on their mitochondrial function, and could potentially lead to the development of new strategies, based on such medicinal plants, to combat devastating human disorders such as neurodegenerative diseases and cancer.

Keywords: *Campanula versicolor*, *Lunaria annua*, Be2C neuroblastoma cancer neuronal cells, oxidative stress, flower extracts

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μεταβολική ροή φυτικών κυττάρων.	15
Εικόνα 2. Ανατομία φυτού	19
Εικόνα 3. Τα μέρη του άνθους	22
Εικόνα 4. Βασική δομή ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών	25
Εικόνα 5. Βασική πορεία βιοσύνθεσης φλαβονοειδών στα φυτά	26
Εικόνα 6. Βασική δομή αγλυκόνης Φλαβόνης	28
Εικόνα 7. Βασική δομή της αγλυκόνης Φλαβονόλης.	29
Εικόνα 8. Βασική δομή μιας αγλυκόνης χαλκόνης	30
Εικόνα 9. Βασική δομή μιας αγλυκόνης αουρόνης	30
Εικόνα 10. Βασική δομή Ξανθόνης	32
Εικόνα 11. Χημική δομή ανθοκυανιδίνης και ανθοκυανίνης	33
Εικόνα 12. Φυτικό κύτταρο	34
Εικόνα 13. Απεικόνιση των πορειών μεταφοράς των ανθοκυανινών μετά την βιοσύνθεση από το ΕΔ στα χυμοτόπια	35
Εικόνα 14. Συσσώρευση ανθοκυανίνης και σύνθεση AVI	35
Εικόνα 15. Βιοσύνθεση των ανθοκυανινών	36
Εικόνα 16. Μηχανισμός δράσης ανθοκυανινών	38
Εικόνα 17. Χρώμα ανθοκυανινών με βάση το pH (1 – 14)	41
Εικόνα 18. Τύποι συγχρωματισμού	43
Εικόνα 19. Κρυσταλλογραφική δομή ακτίνων X της πρωτοκυανίνης (στερεοσκοπική εικόνα)	44
Εικόνα 20. Βασική δομή ανθοκυανιδίνης	48
Εικόνα 21. (α) Οι 6 κύριες ανθοκυανιδίνες και (β) η δομή των ανθοκυανιδινών που αλλάζει με το pH. Το χρώμα με το οποίο απεικονίζονται οι δομές στο σχήμα μοιάζει με το πραγματικό τους.	50
Εικόνα 22 : <i>Lunaria annua</i>	50
Εικόνα 23. Σπόροι <i>Lunaria annua</i>	51
Εικόνα 24 : <i>Campanula versicolor</i>	52
Εικόνα 25. Σπόροι <i>Campanula versicolor</i>	53
Εικόνα 26. Κύτταρα Be2c σε καλλιέργεια	56
Εικόνα 27. Ανάπτυξη νευροβλαστώματος από νευρική ακρολοφία	57
Εικόνα 28. Μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικού στρες από 6 - OHDA	62
Εικόνα 29. Χημική δομή 6 – OHDA	62
Εικόνα 30. Χημική δομή Ροτενόνης	63
Εικόνα 31. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που επάγονται από την Ροτενόνη	64
Εικόνα 32. Κυτταρικός κύκλος και τα 4 σημεία έλεγχου	65
Εικόνα 33. Δομή νερού	68
Εικόνα 34. Πλάκα Neubauer	70
Εικόνα 35. Φωτομέτρηση εκχυλισμάτων από τα φυτά <i>Lunaria annua</i> και <i>Campanula versicolor</i>	73
Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.	79
Εικόνα 37. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c μετά από έκθεση σε τοξίνες 6 – OHDA και Ροτενόνη για 24 h	80

Εικόνα 38. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c μετά από έκθεση σε τοξίνες 6 – OHDA και Ροτενόνη για 48 h	80
Εικόνα 39. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν στις τοξίνες 6- OHDA και Ροτενόνη με αντισώματα Ki67 και Ac – tubulin.	81
Εικόνα 40. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> στη κυτταρική σειρά Be2c.	83
Εικόνα 41. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα πετάλων <i>Lunaria annua</i> για 24 h	84
Εικόνα 42. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα <i>Lunaria annua</i> για 48 h	84
Εικόνα 43. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν στα 25 και 50 μL με αντισώματα Ki67 και Ac – tubulin.	85
Εικόνα 44. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος πετάλων <i>Campanula versicolor</i> στη κυτταρική σειρά Be2c.	87
Εικόνα 45. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα <i>Campanula versicolor</i> για 24 h	88
Εικόνα 46. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα <i>Campanula versicolor</i> για 48 h	88
Εικόνα 47. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε 25 και 50 μL υδατικού εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.	89
Εικόνα 48. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> σε συνδυασμό με τις τοξίνες στη κυτταρική σειρά Be2c.	90
Εικόνα 49. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> (25 μL) και 6-OHDA με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.	91
Εικόνα 50. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> (25 μL) και Ροτενόνη με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.	93
Εικόνα 51. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> σε συνδυασμό με τις τοξίνες στη κυτταρική σειρά Be2c.	95
Εικόνα 52. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> (25 μL) 6-OHDA με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.	96
Εικόνα 53. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό υδατικού εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> (25 μL) και Ροτενόνης με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.	98
Εικόνα 54. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> μετά την απομάκρυνση τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.	100
Εικόνα 55. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> μετά την απομάκρυνση τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.	102
Εικόνα 56. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης - Q-stain 1,5mm gel 12%	104
Εικόνα 57. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης - Q-stain 1mm gel 12%	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Δομές των έξι κοινών ανθοκυανιδινών στα φυτά	49
Πίνακας 2 : Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Η επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση στις τοξίνες 6-OHDA και Ροτενόνη για 48 h.	79
Σχήμα 2. Ο αριθμός των κυττάρων Ki 67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων - πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στις τοξίνες 6- OHD και Ροτενόνη.	82
Σχήμα 3. Επίδραση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση σε υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> για 48 h.	83
Σχήμα 4. Ο αριθμός των κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων - πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Lunaria annua</i> στα 25 και 50μL.	86
Σχήμα 5. Επίδραση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση σε υδατικό εκχύλισμα πετάλων <i>Campanula versicolor</i> για 48 h.	87
Σχήμα 6. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Campanula versicolor</i> στα 25 και 50μL.	90
Σχήμα 7. Χρήση 6 - OHDA στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> για 48 h.	91
Σχήμα 8. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Lunaria annua</i> σε συνδυασμό με την τοξίνη 6- OHDA.	92
Σχήμα 9. Χρήση Ροτενόνης στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Lunaria annua</i> για 48 h.	93
Σχήμα 10. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Lunaria annua</i> σε συνδυασμό με την τοξίνη Ροτενόνη.	94
Σχήμα 11. Χρήση 6- OHDA στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> για 48 h.	95
Σχήμα 12. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Campanula versicolor</i> σε συνδυασμό με την τοξίνη 6-OHDA.	97
Σχήμα 13. Χρήση Ροτενόνη στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος <i>Campanula versicolor</i> για 48 h.	97
Σχήμα 14. Ο αριθμός κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της <i>Campanula versicolor</i> σε συνδυασμό με την τοξίνη Ροτενόνη.	99
Σχήμα 15. 6 - OHDA και υδατικό εκχύλισμα <i>Lunaria annua</i> – Απομάκρυνση {A}	100
Σχήμα 16. Ροτενόνη και υδατικό εκχύλισμα <i>Lunaria annua</i> – Απομάκρυνση {A}	101
Σχήμα 17. 6- OHDA και υδατικό εκχύλισμα <i>Campanula versicolor</i> – Απομάκρυνση {A}	102
Σχήμα 18. Ροτενόνη και υδατικό εκχύλισμα <i>Campanula versicolor</i> – Απομάκρυνση {A}	103

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ 1

1.1 Χρήση φαρμακευτικών φυτών

Τα φυτά και πολλά παραδοσιακά θεραπευτικά συστήματα, όπως η Αγιουβέρδα και η Παραδοσιακή Κινεζική Ιατρική, βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση φαρμακευτικών φυτών. Αν και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο ακριβής χρόνος που τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως φάρμακα, τα στοιχεία δείχνουν ότι η φαρμακευτική χρήση τους χρονολογείται από την αρχαιότητα. Αρχαία κείμενα από την Ινδία, την Κίνα, την Αίγυπτο, την Ελλάδα και την Κεντρική Ασία που χρονολογούνται χιλιάδες χρόνια πριν παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες για τα φαρμακευτικά φυτά και τη χρήση τους στη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Σε όλη την ιστορία, οι άνθρωποι βασίζονταν στα φαρμακευτικά φυτά για τη θεραπεία ασθενειών και τη διατήρηση της καλής τους υγείας. Η χρήση φυτικών θεραπειών αποτελεί σημαντικό μέρος των παραδοσιακών θεραπευτικών συστημάτων και πολλά σύγχρονα φάρμακα εξακολουθούν να προέρχονται από φυτικές πηγές. Καθώς η κατανόησή μας για τη χημεία και τη φαρμακολογία των φυτών συνεχίζει να εξελίσσεται, ενδέχεται να ανακαλύψουμε ακόμη περισσότερες πιθανές πηγές νέων φαρμάκων από το φυτικό βασίλειο.

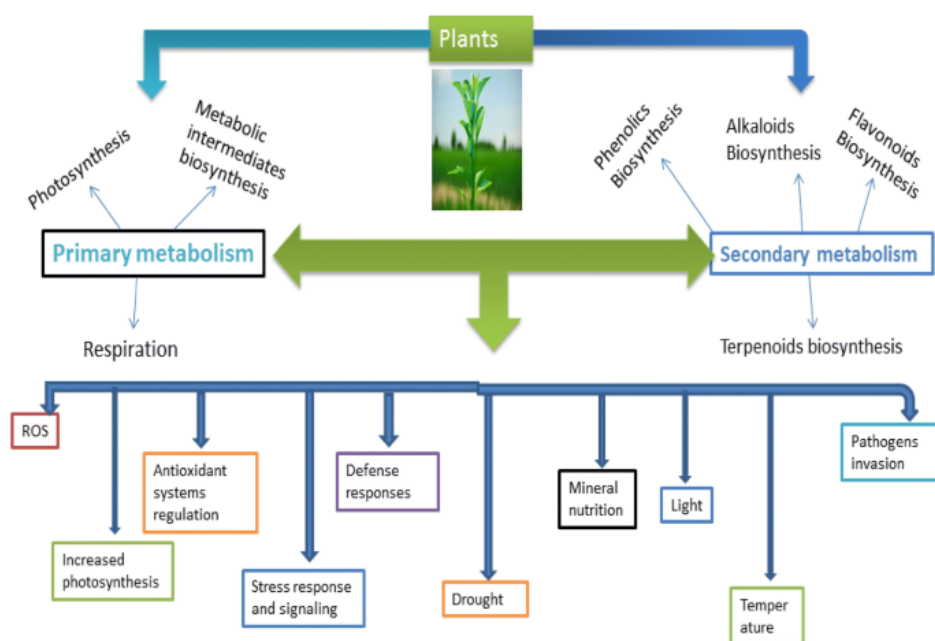
Η χρήση των φαρμακευτικών φυτών μπορεί να εντοπιστεί στους αρχαίους πολιτισμούς, με στοιχεία που δείχνουν ότι οι Αιγύπτιοι και οι Κινέζοι χρησιμοποιούσαν φυτά ως φάρμακο ήδη από τον 27ο αιώνα π.Χ.. Οι αρχαίοι Έλληνες αναγνώρισαν επίσης τις φαρμακευτικές ιδιότητες ορισμένων φυτών, με μορφές όπως ο Ιπποκράτης και ο Αριστοτέλης να τα χρησιμοποιούν στις ιατρικές τους πρακτικές.

Ο Θεόφραστος, Έλληνας επιστήμονας, ίδρυσε τη Σχολή Φαρμακευτικών Φυτών για να διερευνήσει περαιτέρω τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών. Αργότερα, τον πρώτο αιώνα μ.Χ., ο γιατρός και χειρουργός Πεδάνιος Διοσκουρίδης έγραψε μια εγκυκλοπαίδεια με την ονομασία *De Materia Medica*, η οποία περιέγραφε 600 φαρμακευτικά φυτά και τις θεραπευτικές τους χρήσεις.

Η γνώση των φαρμακευτικών φυτών και των χρήσεών τους συνέχισε να εξελίσσεται κατά τη διάρκεια των αιώνων, με πολλές παραδοσιακές ιατρικές πρακτικές που ενσωματώνουν θεραπείες με βάση τα φυτά (Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z. και Amini-Khoei, H., 2017).

Συνεπώς, τα φαρμακευτικά φυτά είναι εκείνα που περιέχουν δραστικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη ή τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ή καταστάσεων υγείας.

Συγκεκριμένα, σε κάθε φυτικό κύτταρο διενεργείται ένα πλήθος χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε οποιαδήποτε μοναδική στιγμή. Το άθροισμα των χημικών αντιδράσεων και διεργασιών ονομάζεται μεταβολισμός. Ο πρωτογενής μεταβολισμός παράγει κυρίως υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ως πρωταρχικές ενώσεις από τις οποίες συνίστανται οι ζωντανοί οργανισμοί. Ο δευτερεύων μεταβολισμός παράγει ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που δεν βρίσκονται σε όλα τα είδη. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις που παράγονται από φυτά, μύκητες και βακτήρια, μεταξύ άλλων οργανισμών. Σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι εμπλέκονται σε βασικές μεταβολικές διεργασίες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι απαραίτητοι για την επιβίωση του οργανισμού, αλλά συχνά έχουν σημαντικές οικολογικές λειτουργίες όπως η άμυνα κατά των θηρευτών, η έλξη των επικονιαστών και η επικοινωνία μεταξύ των οργανισμών. Πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν επίσης βρεθεί ότι έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη φαρμάκων για διάφορες ασθένειες. Παραδείγματα δευτερογενών μεταβολιτών περιλαμβάνουν αλκαλοειδή, τερπενοειδή, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (Μάθι, Α., Hassan, F., & Kader, A. A., 2015).



Εικόνα 1. Μεταβολική ροή φυτικών κυττάρων.

(Πηγή εικόνας : Jha, Y., & Mohamed, H. I., 2022)

Χαρακτηριστικά, οι βιοδραστικές ενώσεις παραμένουν μαζί με άλλες ενώσεις που υπάρχουν στα φυτά. Ο όρος "βιοδραστικές ενώσεις" αναφέρεται σε ενώσεις που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες ή που προέρχονται από ζωντανούς

οργανισμούς. Συνήθως, αυτός ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει ενώσεις που έχουν κάποια σημασία ή επίδραση στα βιολογικά συστήματα.

Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, σάκχαρα και άλλες ουσίες που είναι σημαντικές για τη ζωή και τη λειτουργία των οργανισμών. Πολλές από αυτές τις ενώσεις συμμετέχουν σε βιοχημικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή, η ανοσολογική αντίδραση και άλλες βιολογικές λειτουργίες.

Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να αναγνωριστούν και να χαρακτηριστούν από διάφορα μέρη του φυτού όπως φύλλα, στέλεχος, άνθη και καρποί.

Οι ποσοτικές και ποιοτικές μελέτες βιοδραστικών συστατικών που προέρχονται από φυτά, βασίζονται κυρίως στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης.

Η εκχύλιση είναι το πρώτο βήμα οποιασδήποτε φαρμακευτικής έρευνας που εμπλέκει φυτά και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα, καθώς καθορίζει την ποιότητα, την ποσότητα και την καθαρότητα του εκχυλίσματος.

Η αποτελεσματικότητα της διεργασίας εκχύλισης μπορεί να επηρεάσει την απόδοση και τη βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος και η βέλτιστη μέθοδος εκχύλισης ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του φυτικού υλικού και τις ενώσεις-στόχους. Επομένως, η επιλογή της σωστής μεθόδου εκχύλισης είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων στην ιατρική έρευνα που αφορά τα φυτά (Azmir, Jannatul, et al., 2013).

Τα πρώτα βήματα για τη χρήση βιολογικά ενεργών ενώσεων από φυτικούς πόρους είναι τα εξής:

- **Ταυτοποίηση του φυτικού είδους:** Το πρώτο βήμα είναι ο εντοπισμός των φυτικών ενώσεων που μπορεί να περιέχουν τις επιθυμητές βιοδραστικές ενώσεις. Αυτό γίνεται με διάφορους τρόπους, όπως βιβλιογραφική ανασκόπηση, μακροσκοπική παρατήρηση, διαβούλευση με ειδικούς, μοριακή ανάλυση δειγμάτων φυτών, κ.άλ.
- **Συλλογή και επεξεργασία φυτικών υλικών:** Αφού εντοπιστούν οι βιοδραστικές ενώσεις, το επόμενο βήμα είναι η συλλογή των φυτικών υλικών από τον φυσικό βιότοπο ή τις καλλιεργούμενες περιοχές. Μετά τη συλλογή, τα φυτικά υλικά υποβάλλονται σε επεξεργασία για να αφαιρεθούν τα ανεπιθύμητα μέρη, όπως οι ρίζες, οι μίσχοι και τα φύλλα, και να προετοιμαστούν για εκχύλιση

- **Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων:** Οι βιοδραστικές ενώσεις εξάγονται από τα φυτικά υλικά χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους όπως διαβροχή, διήθηση, εκχύλιση Soxhlet και εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό. Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης εξαρτάται από τη φύση των βιοδραστικών ενώσεων και τις ιδιότητες των φυτικών υλικών
- **Καθαρισμός και χαρακτηρισμός βιοδραστικών ενώσεων:** Μετά την εκχύλιση, οι βιοδραστικές ενώσεις καθαρίζονται και χαρακτηρίζονται χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές όπως χρωματογραφία, φασματοσκοπία και φασματομετρία μάζας. Αυτό βοηθά στον προσδιορισμό της χημικής δομής και της καθαρότητας των ενώσεων
- **Βιολογική αξιολόγηση βιοδραστικών ενώσεων:** Οι βιοδραστικές ενώσεις στη συνέχεια αξιολογούνται για τη βιολογική τους δράση χρησιμοποιώντας διάφορες *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες. Αυτό βοηθά στον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειάς τους για χρήση σε ιατρικές εφαρμογές
- **Σύνθεση και ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων:** Τέλος, οι βιοδραστικές ενώσεις διαμορφώνονται και αναπτύσσονται σε φαρμακευτικά προϊόντα όπως δισκία, κάψουλες, κρέμες και αλοιφές, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών και διαταραχών (Μαγούλα Μ., 2020)

1.2 Απομόνωση δραστικών ουσιών από τα φυτά

Οι δραστικές ουσίες απομονώνονται από τα φαρμακευτικά φυτά με διάφορες μεθόδους.

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών εκχύλισης κατά την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά, όπως:

Φυτικό υλικό: Ο τύπος του φυτικού υλικού που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της διεργασίας εκχύλισης. Παράγοντες όπως η ηλικία του φυτού, μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται και ο χρόνος συγκομιδής μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα και την ποσότητα των εκχυλισμένων βιοδραστικών ενώσεων

Τύπος και ιδιότητες διαλύτη: Η επιλογή του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση είναι σημαντική, καθώς μπορεί να επηρεάσει την απόδοση και την επιλεκτικότητα της εκχύλισης. Παράγοντες όπως η πολικότητα, το σημείο

βρασμού και το ιξώδες του διαλύτη μπορούν να επηρεάσουν τη διαλυτότητα των βιοδραστικών ενώσεων

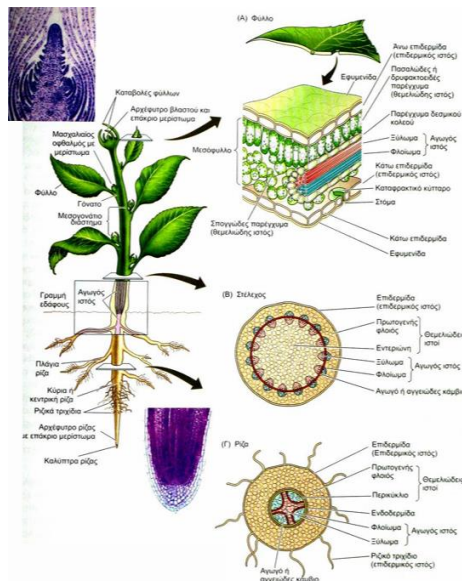
Μέθοδος εκχύλισης: Η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την επιλεκτικότητα της διεργασίας εκχύλισης. Διαφορετικές μέθοδοι έχουν διαφορετικούς βαθμούς αποτελεσματικότητας, επιλεκτικότητας και ασφάλειας, ανάλογα με τη βιοδραστική ένωση και την προβλεπόμενη εφαρμογή

Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης: Ο χρόνος και η θερμοκρασία της διαδικασίας εκχύλισης μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα των βιοδραστικών ενώσεων, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αποικοδόμηση των ενώσεων ή απώλεια πτητικών ενώσεων. Ο χρόνος εκχύλισης μπορεί επίσης να επηρεάσει την απόδοση της εκχύλισης. όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος εκχύλισης, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόδοση. Περισσότερος χρόνος επιτρέπει την καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στο φυτικό υλικό και αυξημένη διαλυτότητα των ενώσεων-στόχων.

pH του διαλύτη: Το pH του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα των βιοδραστικών ενώσεων. Για παράδειγμα, ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να είναι πιο διαλυτές σε όξινο pH, ενώ άλλες μπορεί να είναι πιο διαλυτές σε αλκαλικό pH.

Μέγεθος σωματιδίων του φυτικού υλικού: Το μέγεθος του φυτικού υλικού που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης. Τα μικρότερα μεγέθη σωματιδίων μπορούν να αυξήσουν την επιφάνεια του φυτικού υλικού, οδηγώντας σε αυξημένη απόδοση εκχύλισης

Παρουσία παρεμβαλλόμενων ενώσεων: Άλλες ενώσεις που υπάρχουν στο φυτικό υλικό μπορεί να επηρεάσουν τη διαδικασία εκχύλισης, επηρεάζοντας την εκλεκτικότητα και την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης.



Εικόνα 2. Ανατομία φυτού

(Πηγή εικόνας : opencourses.uoc.gr)

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για την εξαγωγή φυτικών υλικών, με τις μη συμβατικές μεθόδους να είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον καθώς χρησιμοποιούν λιγότερα συνθετικά και οργανικά χημικά, έχουν μικρότερο χρόνο επεξεργασίας και προσφέρουν καλύτερη απόδοση και ποιότητα εκχυλίσματος. Αυτές οι μη συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση υπερήχων, παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, μικροκυμάτων και υπερκρίσιμων ρευστών όπως έχει αναπτυχθεί κατά τα τελευταία 50 χρόνια. Αντίθετα, συμβατικές τεχνικές όπως η μέθοδος Soxhlet εξακολουθούν να θεωρούνται μέθοδοι αναφοράς και μετρούν την επιτυχία των καινοτόμων τεχνικών σύγκρισης. Όλες αυτές οι τεχνικές έχουν μελετηθεί για τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης και επιλεκτικότητας βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά (Γούσιας Γ., 2017).

Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης :

- **Διαβροχή:** Η διαβροχή περιλαμβάνει εμβάπτιση του φυτικού υλικού σε διαλύτη, συνήθως αιθανόλη ή νερό, για παρατεταμένη χρονική περίοδο ώστε να επιτραπεί στον διαλύτη να εκχυλίσει τις βιοδραστικές ενώσεις (Chaves, Jaísa Oliveira, et al., 2020)
- **Διήθηση:** Η διήθηση περιλαμβάνει τη διέλευση ενός διαλύτη μέσω μιας στήλης γεμάτη με φυτικό υλικό για την εξαγωγή των βιοδραστικών ενώσεων. Ο διαλύτης μπορεί είτε να τροφοδοτηθεί με βαρύτητα είτε να αντληθεί μέσω της στήλης (Abubakar A. P. & Haque M., 2020)

- **Εκχύλιση Soxhlet:** Η εκχύλιση Soxhlet περιλαμβάνει επανειλημμένη ανακύκλωση ενός διαλύτη μέσω μιας δακτυλήθρας που περιέχει το φυτικό υλικό χρησιμοποιώντας έναν συμπυκνωτή και σωλήνα σιφωνίου για την εξαγωγή των βιοδραστικών ενώσεων (Chaves, Jaísa Oliveira, et al., 2020)
- **Απόσταξη με ατμό:** Η απόσταξη με ατμό περιλαμβάνει τη διέλευση ατμού μέσω του φυτικού υλικού για την εξαγωγή πτητικών ενώσεων, οι οποίες στη συνέχεια συμπυκνώνονται και συλλέγονται (Chaves, Jaísa Oliveira, et al., 2020)
- **Εκχύλιση με διαλύτη:** Η εκχύλιση με διαλύτη περιλαμβάνει ανάμειξη του φυτικού υλικού με έναν διαλύτη, συνήθως έναν πολικό διαλύτη όπως μεθανόλη ή αιθανόλη, ή έναν μη πολικό διαλύτη όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο, για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων (Abubakar, A. P., & Haque, M., 2020)

Αυτές οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν αναπτυχθεί εδώ και πολλά χρόνια. Έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανάλογα με τη φύση του φυτικού υλικού και των βιοδραστικών ενώσεων που εκχυλίζονται. Για παράδειγμα, η διαβροχή είναι μια απλή και χαμηλού κόστους τεχνική, αλλά μπορεί να είναι χρονοβόρα και λιγότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με άλλες τεχνικές όπως η εξαγωγή Soxhlet. Ομοίως, η απόσταξη με ατμό είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση πτητικών ενώσεων, αλλά μπορεί να μην είναι κατάλληλη για την εκχύλιση μη πτητικών ενώσεων.

Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

Εκτός από τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, υπάρχουν επίσης αρκετές μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης που έχουν αναπτυχθεί για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υλικά. Μερικές από αυτές τις μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης περιλαμβάνουν:

- **Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Extraction - MAE):** Η MAE περιλαμβάνει τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων για την ταχεία θέρμανση του διαλύτη και του φυτικού υλικού, γεγονός που αυξάνει

τον ρυθμό εκχύλισης. Η MAE είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική εκχύλισης, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αποδόμηση ορισμένων υπερευαίσθητων ενώσεων(Osorio-Tobón, J. F., 2020)

- **Εξαγωγή με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound-Assisted Extraction - UAE):** Η HAE περιλαμβάνει τη χρήση κυμάτων υπερήχων για την ανάδευση του διαλύτη και του φυτικού υλικού, γεγονός που ενισχύει τη μεταφορά μάζας των βιοδραστικών ενώσεων. Η HAE είναι μια ήπια και μη καταστροφική τεχνική εξαγωγής, αλλά μπορεί επίσης να απαιτήσει μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης σε σύγκριση με άλλες τεχνικές(Osorio-Tobón, J. F., 2020)
- **Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Supercritical Fluid Extraction - SFE):** Η SFE περιλαμβάνει τη χρήση ενός υπερκρίσιμου ρευστού, συνήθως διοξειδίου του άνθρακα, για την εξαγωγή των βιοδραστικών ενώσεων από το φυτικό υλικό. Η SFE μπορεί να είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική εξαγωγής, αλλά μπορεί επίσης να απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και μπορεί να είναι ακριβή(Osorio-Tobón, J.F., 2020)
- **Υγρή εκχύλιση υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction - PLE):** Η PLE περιλαμβάνει τη χρήση υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας για την εξαγωγή των βιοδραστικών ενώσεων από το φυτικό υλικό. Η PLE είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική εξαγωγής, αλλά μπορεί επίσης να απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και μπορεί να είναι ακριβή(Osorio-Tobón, J. F., 2020)
- **Εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων (Enzyme-Assisted Extraction -EAE):** Η EAE περιλαμβάνει τη χρήση ενζύμων για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτικού υλικού, γεγονός που αυξάνει τον ρυθμό εκχύλισης. Η EAE μπορεί να είναι μια ήπια και επιλεκτική τεχνική εκχύλισης, αλλά μπορεί να απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης και να είναι ακριβή(Lubek-Nguyen, A., Ziemichód, W., & Olech, M., 2022)

Αυτές οι μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές, όπως ταχύτερους χρόνους εκχύλισης, υψηλότερες αποδόσεις και πιο επιλεκτική εκχύλιση συγκεκριμένων ενώσεων. Ωστόσο, μπορεί επίσης να απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό, να είναι πιο ακριβές και να έχουν περιορισμούς ανάλογα με τον τύπο του φυτικού υλικού και τις βιοδραστικές ενώσεις που εξάγονται.

1.3 Μορφολογία άνθους

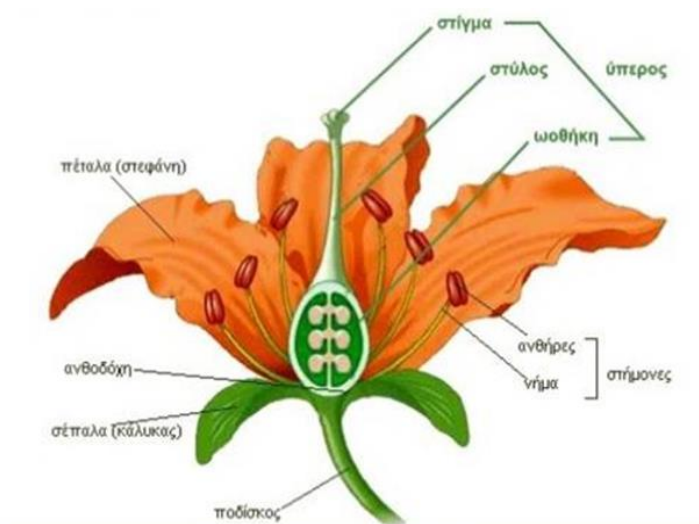
Το άνθος είναι η αναπαραγωγική δομή των σπερματοφύτων, ή των φυτών σπόρων. Συνήθως, αποτελείται από πολλά εξειδικευμένα μέρη που συνεργάζονται για να διευκολύνουν την αναπαραγωγή. Αυτά τα μέρη περιλαμβάνουν τα σέπαλα, τα πέταλα, τους στήμονες και τα καρπόφυλλα.

Τα σέπαλα είναι το πιο εξωτερικό στρώμα του άνθους και προστατεύουν τον αναπτυσσόμενο οφθαλμό. Τα πέταλα είναι το πολύχρωμο, επιδεικτικό μέρος του άνθους και συχνά χρησιμεύουν για να προσελκύουν επικονιαστές.

Οι στήμονες είναι τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα του άνθους και παράγουν κόκκους γύρης που περιέχουν σπερματοζωάρια. Τα καρπόφυλλα, από την άλλη πλευρά, είναι τα γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα του άνθους και παράγουν ωάρια.

Στα μονοκοτυλήδονα είδη, τα σέπαλα και τα πέταλα συχνά δεν διακρίνονται μεταξύ τους και αναφέρονται ως τέπαλα. Τα τέπελα είναι συνήθως μεγάλα, έχουν έντονα χρώματα και βοηθούν στην προσέλκυση εντόμων για επικονίαση.

Ορισμένα είδη φυτών έχουν άνθη με εντελώς διαφορετική δομή από την τυπική μορφή, όπως τα χόρτα. Αυτά τα άνθη μπορεί να έχουν πολλά βράκτια, τα οποία είναι τροποποιημένα φύλλα που περιβάλλουν και προστατεύουν τα αναπτυσσόμενα άνθη.



Εικόνα 3. Τα μέρη του άνθους

(Πηγή εικόνας : votaniki.gr)

Στα περισσότερα ανθοφόρα φυτά, τα άνθη περιέχουν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά αναπαραγωγικά μέρη, καθιστώντας τα ερμαφρόδιτα ή αμφιφυλόφιλα. Αυτά τα άνθη αναφέρονται ως “τέλεια” άνθη και διευκολύνουν την αυτογονιμοποίηση ή τη διασταύρωση με άλλα λουλούδια.

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα είδη φυτών που έχουν ξεχωριστά αρσενικά και θηλυκά άνθη. Αυτά τα φυτά αναφέρονται ως μονόοικα και παράγουν αρσενικά και θηλυκά άνθη στο ίδιο μεμονωμένο φυτό. Τα αρσενικά άνθη παράγουν συνήθως γύρη ενώ τα θηλυκά άνθη παράγουν ωάρια, τα οποία μπορεί να γονιμοποιηθούν από τη γύρη.

Αντίθετα, υπάρχουν άλλα είδη φυτών που έχουν αρσενικά και θηλυκά άνθη σε ξεχωριστά μεμονωμένα φυτά. Αυτά τα φυτά ονομάζονται δίοικα και έχουν είτε όλα τα αρσενικά είτε όλα τα θηλυκά άνθη. Αυτό σημαίνει ότι ένα μεμονωμένο φυτό παράγει μόνο αρσενικά άνθη, ενώ ένα άλλο μεμονωμένο φυτό παράγει μόνο θηλυκά άνθη.

Η διάκριση μεταξύ μονόοικων και δίοικων ειδών είναι μια σημαντική πτυχή της φυτικής αναπαραγωγικής βιολογίας, καθώς επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο αυτά τα φυτά αναπαράγονται και αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους.

Εκτός από τα τυπικά λουλούδια που έχουν επιδεικτικά πέταλα ή τέπαλα που προσελκύουν τους επικονιαστές, υπάρχουν επίσης λουλούδια που είναι δυσδιάκριτα. Αυτά είναι μικρά λουλούδια που δεν έχουν πέταλα και σέπαλα και φέρουν μόνο τις αρσενικές και θηλυκές αναπαραγωγικές δομές.

Τα δυσδιάκριτα άνθη συχνά επικονιάζονται από τον άνεμο, καθώς δεν έχουν τα οπτικά σημάδια που προσελκύουν έντομα ή άλλους επικονιαστές. Αυτά τα άνθη βρίσκονται σε πολλά γυμνόσπερμα και μερικά αγγειόσπερμα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή αυτών των φυτών.

Σε αντίθεση με τα επιδεικτικά άνθη, τα δυσδιάκριτα άνθη είναι συχνά δύσκολο να εντοπιστούν χωρίς προσεκτική εξέταση και μπορεί να παραβλεφθούν από πολλούς ανθρώπους. Ωστόσο, είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την εξέλιξη πολλών φυτικών ειδών, καθώς διευκολύνουν τη μεταφορά της γύρης από τις αρσενικές σε θηλυκές δομές και την παραγωγή βιώσιμων σπόρων (Μποζαμπαλίδης, 2015).

1.4 Το χρώμα των ανθέων

Το χρώμα των ανθέων καθορίζεται κυρίως από τις χρωστικές που υπάρχουν στους ιστούς τους, οι οποίες είναι συνήθως φλαβονοειδή ή σχετικές ενώσεις. Αυτές οι χρωστικές απορροφούν ορισμένα μήκη κύματος φωτός, γεγονός που τους δίνει το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Οι συγκεκριμένες χρωστικές που υπάρχουν σε ένα άνθος εξαρτώνται από το είδος του φυτού και το στάδιο ανάπτυξής του.

Τα φλαβονοειδή είναι οι πιο κοινές χρωστικές στα άνθη και μπορούν να χωριστούν σε διάφορες ομάδες με βάση τη χημική τους δομή. Τα πιο γνωστά φλαβονοειδή είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, το μωβ και το μπλε χρώμα πολλών ανθέων. Άλλα φλαβονοειδή, όπως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι χαλκόνες, μπορούν να παράγουν κίτρινο, κρεμώδη χρωματισμό.

Η σύνθεση των φλαβονοειδών ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο γονιδίων αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως το φως, η θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Για παράδειγμα, η έκθεση σε ακτινοβολία UV-B μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή φλαβονοειδών στους ιστούς των φυτών, κάτι που βοηθά στην προστασία τους από την υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον, ορισμένα είδη φυτών έχουν εξελίξει εξειδικευμένες δομές, όπως χρωστικές ουσίες και τριχώματα που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, για να προστατεύουν περαιτέρω τα άνθη τους από τη φθορά της υπεριώδους ακτινοβολίας.

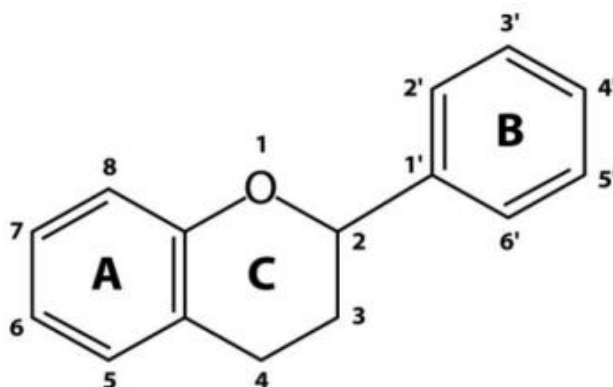
Το χρώμα των ανθέων μπορεί επίσης να έχει σημαντικές οικολογικές και εξελικτικές επιπτώσεις. Το χρώμα των ανθέων μπορεί να προσελκύσει επικονιαστές, όπως οι μέλισσες και οι πεταλούδες, και μπορεί επίσης να αποτρέψει τα φυτοφάγα και τα αρπακτικά των σπόρων. Το χρώμα των ανθέων μπορεί επίσης να επηρεαστεί από γενετικές παραλλαγές μέσα σε έναν πληθυσμό, η οποία μπορεί να επηρεάσει την προτίμηση των επικονιαστών και να συμβάλει στην ειδογένεση (Μποζαμπαλίδης, 2015).

Συνολικά, το χρώμα των ανθέων είναι ένα σύνθετο και δυναμικό χαρακτηριστικό που διαμορφώνεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες και έχει σημαντικές οικολογικές και εξελικτικές συνέπειες.

1.5 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Η βασική τους δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, τους δακτυλίους A και B, οι οποίοι συνδέονται με μια τριμελή γέφυρα που σχηματίζει έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο, τον δακτύλιο C. Αυτή η δομή αναφέρεται συνήθως ως σκελετός φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή μπορούν να έχουν μια ποικιλία υποκαταστατών στους δακτυλίους A, B και C, συμπεριλαμβανομένων των υδροξυλομάδων, των μεθυλομάδων, των σακχάρων, των οργανικών οξέων και των μονάδων ισοπρενίου. Αυτοί οι υποκαταστάτες μπορούν να αλλάξουν σημαντικά τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του μορίου των φλαβονοειδών, όπως η διαλυτότητα, η σταθερότητα και η βιοδραστικότητα.

Λόγω της δομικής τους ποικιλομορφίας, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Είναι επίσης υπεύθυνα για τα χρώματα πολλών φυτικών ιστών, συμπεριλαμβανομένων των ανθέων, των καρπών και των φύλλων. Η ποικιλομορφία των φλαβονοειδών και οι βιολογικές τους δραστηριότητες τα καθιστούν σημαντικό τομέα μελέτης στη βιολογία των φυτών και στη φαρμακευτική χημεία (Κουτροπούλου Ν.Κ., 2018).



Εικόνα 4. Βασική δομή ανθρακικού σκελετού των φλαβονοειδών

(Πηγή εικόνας : Κουτροπούλου Ν.Κ., 2018)

Τα φλαβονοειδή βρίσκονται συχνά στα φυτά ως γλυκοζίτες (αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών ενώσεων που περιλαμβάνουν τη γλυκόζη ή άλλα σάκχαρα) ως μέρος του μοριακού τους σκελετού. Αυτές οι ενώσεις συνήθως βρίσκονται στα φυτά και παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταφορά και τον αποθεματισμό των σακχάρων), γεγονός που τα καθιστά υδατοδιαλυτά και τους επιτρέπει να αποθηκεύονται στα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων. Η διεργασία γλυκοζυλίωσης περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός μορίου σακχάρου στο φλαβονοειδές αγλυκόνι μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού.

Αυτή η τροποποίηση μπορεί να αλλάξει σημαντικά τις βιολογικές ιδιότητες του φλαβονοειδούς, όπως η διαλυτότητα, η σταθερότητα και η βιοδραστηριότητά του.

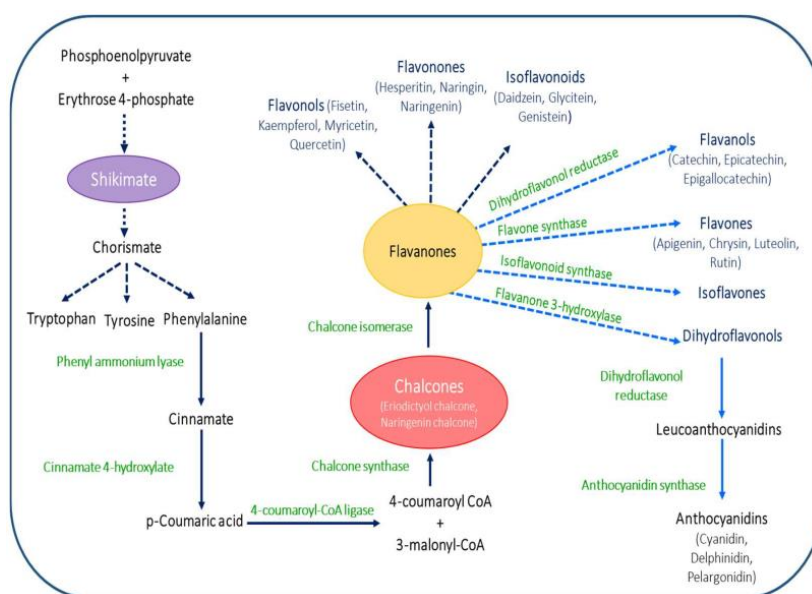
Ορισμένα φλαβονοειδή δεν είναι γλυκοζυλιωμένα και είναι γνωστά ως αγλυκόνες. Τα πολυμεθυλιωμένα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν με τη μορφή κεριών ή κρυστάλλων σε ορισμένα φυτικά όργανα. Τα φλαβονοειδή συντίθενται από τα φυτά και έχουν εντοπιστεί σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των σπερματόφυτων, των πτεριδόφυτων και των βρυόφυτων. Η βιοσυνθετική ικανότητα των φλαβονοειδών είναι μοναδική στα φυτά και έχει χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις ως χημειοταξονομικός δείκτης για την αναγνώριση φυτικών ειδών.

Τα φλαβονοειδή έχουν μια ποικιλία βιολογικών λειτουργιών στα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία, της προσέλκυσης των επικονιαστών και της άμυνας έναντι φυτοφάγων και παθογόνων.

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών και εκτός από τις ανθοκυανίνες, υπάρχουν πολλές άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών με διαφορετικές λειτουργίες και δομές. Για παράδειγμα, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβανόνες είναι όλοι οι συνήθεις τύποι φλαβονοειδών που βρίσκονται στα φυτά. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες έχουν συχνά κίτρινο ή λευκό χρώμα, ενώ οι φλαβανόνες είναι συνήθως άχρωμες. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με την

πορεία του σικιμικού οξέος, η οποία παράγει φαινυλαλανίνη και τυροσίνη ως πρόδρομες ουσίες. Αυτά τα αμινοξέα στη συνέχεια μετατρέπονται σε κινναμωμικό οξύ και *π*-κουμαρικό οξύ, αντίστοιχα, με τη δράση της λυάσης της αμμωνίας και της φαινυλαλανίνης (PAL) και της λυάσης της αμμωνίας και της τυροσίνης (TAL).

Το επόμενο βήμα στη βιοσύνθεση φλαβονοειδών είναι η μετατροπή του κινναμωμικού οξέος και του *π*-κουμαρικού οξέος στους αντίστοιχους εστέρες CoA με τη δράση των λιγασών ακυλο-CoA. Αυτοί οι εστέρες CoA χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως υποστρώματα για τη συνθάση των χαλκονών (CHS), η οποία καταλύει τον σχηματισμό χαλκονών. Οι χαλκόνες είναι οι πρόδρομες ουσίες για τα περισσότερα φλαβονοειδή και μπορούν περαιτέρω να μετατραπούν σε διαφορετικές κατηγορίες φλαβονοειδών μέσω της δράσης συγκεκριμένων ενζύμων.



Εικόνα 5. Βασική πορεία βιοσύνθεσης φλαβονοειδών στα φυτά

(Πηγή εικόνας : Shomali, Aida, et al., 2022)

Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης φλαβονοειδών είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από μια ποικιλία περιβαλλοντικών και αναπτυξιακών παραγόντων. Για παράδειγμα, το φως είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της παραγωγής φλαβονοειδών σε πολλά είδη φυτών και μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών. Επιπλέον, το στρες όπως η επίθεση παθογόνου ή το φυτοφάρμακο μπορούν επίσης να διεγείρουν την παραγωγή φλαβονοειδών σε ορισμένα φυτά (Κουτροπούλου Ν.Κ., 2018).

Τα φλαβονοειδή συντίθενται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων και μετά τη γλυκοζυλίωση, τυπικά μεταφέρονται στο χυμοτόπιο ή σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, όπου μπορούν να συσσωρευτούν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τα

φλαβονοειδή είναι ευρέως κατανεμημένα σε όλους τους φυτικούς ιστούς και μπορούν να βρεθούν στα φύλλα, τους μίσχους, τα άνθη, τους καρπούς και τις ρίζες.

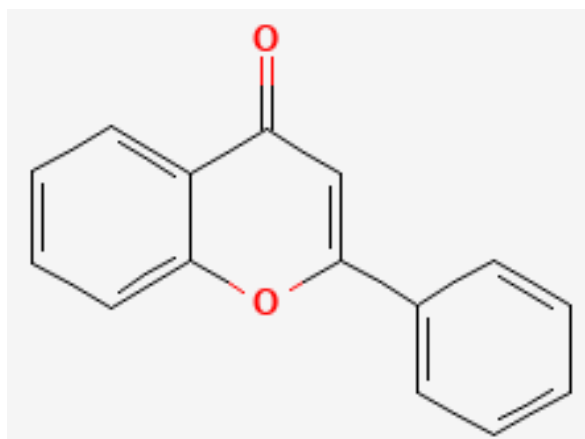
Τα φλαβονοειδή μπορούν να απορροφήσουν το υπεριώδες φως στην περιοχή των 250-350 nm, το οποίο βοηθά στην πρόληψη της βλάβης στο DNA και σε άλλα κυτταρικά συστατικά. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα και μπορεί να παίζουν ρόλο στην προστασία των φυτών από το οξειδωτικό στρες και άλλους τύπους περιβαλλοντικού στρες. Τα ειδικά φάσματα απορρόφησης των φλαβονοειδών μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τη χημική δομή και τις λειτουργικές τους ομάδες. Για παράδειγμα, ορισμένα φλαβονοειδή απορροφούν στην περιοχή των 520-550 nm, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στο χρώμα τους και μπορεί επίσης να έχει σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Glover, 2014).

1.5.1 Φλαβόνες

Οι φλαβόνες είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών που χαρακτηρίζονται από διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα C2 και C3 στον δακτύλιο C της δομής των φλαβονοειδών. Αυτό το δομικό χαρακτηριστικό δίνει στις φλαβόνες μοναδικές χημικές και βιολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με άλλα φλαβονοειδή. Μερικά κοινά παραδείγματα φλαβονών περιλαμβάνουν απιγενίνη, λουτεολίνη και βαϊκελαΐνη. Αυτές οι ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε μια ποικιλία φυτών, συμπεριλαμβανομένου του μαϊντανού και του χαμομηλιού (Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E., 2016).

Οι φλαβόνες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν μια σειρά βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, η απιγενίνη και η λουτεολίνη έχουν μελετηθεί για τις πιθανές αντικαρκινικές τους επιδράσεις, καθώς έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) σε καρκινικά κύτταρα και αναστέλλουν την ανάπτυξη όγκου σε ζωικά μοντέλα (Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E., 2016).

Οι φλαβόνες μπορεί επίσης να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Για παράδειγμα, η βαϊκελαΐνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την αρτηριακή πίεση σε μελέτες σε ζώα, ενώ η απιγενίνη έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου και μειώνει τη φλεγμονή σε μελέτες σε ανθρώπους (Jucá, Mércia Marques, et al., 2020).



Εικόνα 6. Βασική δομή αγλυκόνης Φλαβόνης

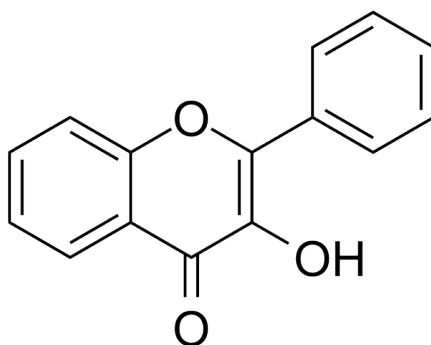
(Πηγή εικόνας : www.molport.com)

1.5.2 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών που περιέχουν τον κορμό 3-υδροξυφλαβόνης με έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου και/ή σακχάρου. Οι πιο κοινές φλαβονόλες που βρίσκονται στα φυτά είναι η κερσετίνη, η καμπφερόλη και η μυρικετίνη. Υπάρχουν σε διάφορα μέρη των φυτών όπως φύλλα, άνθη και καρπούς (Kothari, D., Lee, W. D., & Kim, S. K., 2020).

Οι φλαβονόλες είναι άχρωμες στο ορατό φάσμα, αλλά μπορούν να συμβάλλουν στο λευκό ή υπόλευκο χρώμα των λουλουδιών. Μεταφέρουν οξυγονωμένους υποκαταστάτες στον 3ο άνθρακα του ετεροκυκλικού δακτυλίου και σε ορισμένες περιπτώσεις ευθύνονται για το έντονο κίτρινο χρώμα των ανθέων. Οι φλαβονόλες που απορροφούν φως στην υπεριώδη περιοχή μπορούν να σχηματίσουν περιοχές στο άνθος που ξεχωρίζουν από το φόντο και γίνονται εύκολα αντιληπτές από το σύστημα όρασης των μελισσών ή άλλων εντόμων που επικονιάζουν ή είναι υπεύθυνες για τα υπεριώδη χρωματικά μοτίβα στο άνθος. Εκτός από τα άνθη, οι φλαβονόλες βρίσκονται επίσης σε μεγάλο βαθμό στα φύλλα.

Οι φλαβονόλες, συμμετέχουν επίσης στην προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία στα φυτά και έχει προταθεί ότι έχουν πιθανά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, η κερσετίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδη και αντισταμινικά αποτελέσματα και μπορεί να έχει δυνατότητες στην πρόληψη και θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνος και νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Kruk, Joanna, et al., 2022).



Εικόνα 7. Βασική δομή της αγλυκόνης Φλαβονόλης.

(Πηγή εικόνας : www.medchemexpress.com)

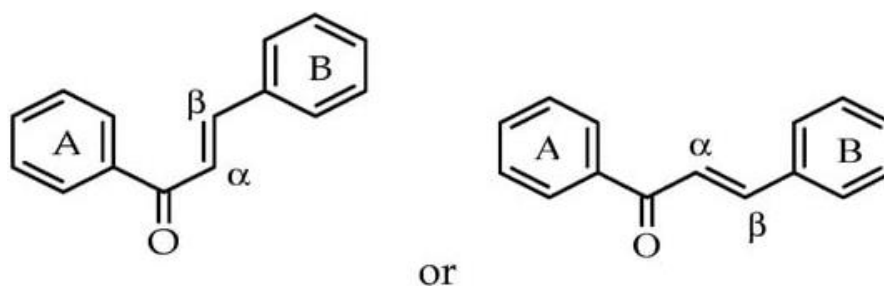
1.5.3 Χαλκόνες

Οι χαλκόνες έχουν μια βασική δομή που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα τριανθρακικό σύστημα α-, β-ακόρεστων καρβονυλίων (Εικόνα 8). Αυτή η δομή τα καθιστά πρόδρομο για τη σύνθεση φλαβονοειδών και ισοφλαβονοειδών. Είναι άχρωμα ή ωχροκίτρινα στη φύση και βρίσκονται συνήθως σε διάφορα μέρη φυτών όπως φύλλα, άνθη και ρίζες (Salehi, Bahare, et al., 2021).

Οι χαλκόνες έχουν βρεθεί ότι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων και έχουν διερευνηθεί οι δυνατότητές τους στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Οι χαλκόνες συντίθενται μέσω της οδού οξικού-μηλονικού στα φυτά, η οποία περιλαμβάνει τη συμπύκνωση τριών μορίων μηλονυλο-CoA με ένα μόριο p-κουμαροϋλ-CoA, το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι του φαινυλοπροπανοειδούς (Elkanzi, Nadia AA, et al., 2022).

Μερικά παραδείγματα χαλκονών που βρίσκονται στα φυτά περιλαμβάνουν την ισολικοιριτιγενίνη, τη βουτεΐνη και την ξανθοχουμόλη. Η ισολικοιριτιγενίνη βρίσκεται στη ρίζα της γλυκόριζας και έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Η βουτεΐνη βρίσκεται στο φλοιό του δέντρου κάσιους και έχει ερευνηθεί για τις δυνατότητές της στη θεραπεία του καρκίνου. Η ξανθοχουμόλη βρίσκεται στον λυκίσκο και έχει μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της.

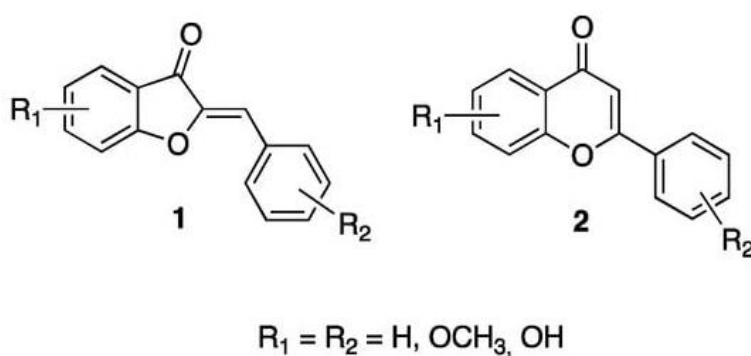


Εικόνα 8. Βασική δομή μιας αγλυκόνης χαλκόνης

(Πηγή εικόνας : Salehi Bahare, et al., 2021)

1.5.4 Αουρόνες

Οι αουρόνες (aurones) είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών με βασική δομή που αποτελείται από έναν δακτύλιο βενζοφουρανόνης (βενζοπυρανόνης) που συντήκεται με έναν δακτύλιο βενζολίου. Ο δακτύλιος βενζοφουρανόνης είναι επίσης γνωστός ως ο δακτύλιος C του σκελετού των φλαβονοειδών. Οι αουρόνες έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων και βρίσκονται σε διάφορα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των μελών των οικογενειών Asteraceae, Fabaceae και Moraceae (Mazziotti, I., Petrarolo, G., & La Motta, C. 2021).



Εικόνα 9. Βασική δομή μιας αγλυκόνης αουρόνης

(Πηγή εικόνας : Mazziotti I, Petrarolo G., & La Motta C, 2021)

1.5.5 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών, τα οποία είναι μια ομάδα φυσικών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά. Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από μια δομή κορμού 15 ατόμων άνθρακα, με δύο αρωματικούς δακτυλίους και έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο που περιέχει ένα άτομο οξυγόνου. Βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή, όπως τα πορτοκάλια, τα λεμόνια και τα γκρέιπφρουτ, και είναι υπεύθυνα για ορισμένες από τις χαρακτηριστικές πικρές και ξινές γεύσεις αυτών των φρούτων.

Έχει αποδειχθεί πως οι φλαβανόνες μειώνουν την αρτηριακή πίεση και τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων. Επιπλέον, ορισμένες φλαβανόνες, όπως η ναρινγενίνη, έχουν μελετηθεί για τις πιθανές αντικαρκινικές τους επιδράσεις (Stevens, Yala, et al., 2019).

1.5.6 Ισοφλαβονοειδή

Τα ισοφλαβονοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών οργανικών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών. Είναι δομικά παρόμοια με τα φλαβονοειδή, αλλά περιέχουν έναν σκελετό 3-φαινυλοχρωμεν-4-όνης, ο οποίος διαφέρει από τον σκελετό των φλαβονοειδών 2-φαινυλοχρωμεν-4-όνης. Τα ισοφλαβονοειδή βρίσκονται συνήθως στα όσπρια, όπως η σόγια και τα ρεβίθια (Dewick, P. M., 2017).

Τα ισοφλαβονοειδή μιμούνται τις επιδράσεις των οιστρογόνων στον οργανισμό. Ορισμένα ισοφλαβονοειδή, όπως η γενιστεΐνη και η νταϊτζεΐνη, έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και ασκούν ασθενείς οιστρογονικές δράσεις. Ως αποτέλεσμα, τα ισοφλαβονοειδή έχουν μελετηθεί για την πιθανή χρήση τους στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και στη μείωση του κινδύνου καρκίνων που σχετίζονται με τις ορμόνες, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη. Εκτός από τις οιστρογονικές τους δράσεις, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και βελτιώνουν τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων (Dewick, P. M., 2017).

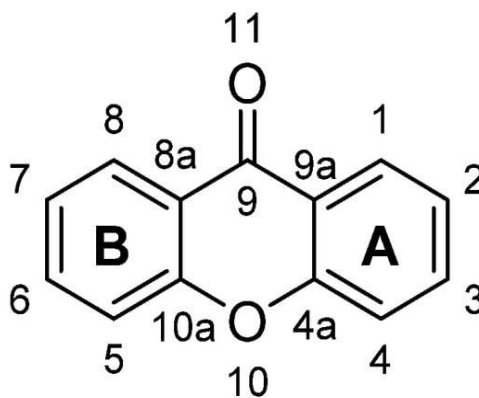
1.5.7 Διφλαβονοειδή

Τα διφλαβονοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών ενώσεων που αποτελούνται από δύο μόρια φλαβονοειδών που συνδέονται με έναν συνδέτη. Χαρακτηρίζονται από τις μοναδικές δομές και τις ποικίλες βιολογικές τους δραστηριότητες. Τα διφλαβονοειδή βρίσκονται συνήθως σε φυτά, όπως το *Ginkgo biloba* και η *Garcinia kola*, και πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών.

Τα διφλαβονοειδή έχουν μελετηθεί για τα πιθανά οφέλη τους για την υγεία, ιδιαίτερα τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Έχει αποδειχθεί ότι καθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και προστατεύουν τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη. Επιπλέον, ορισμένα διφλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντικαρκινικά αποτελέσματα, όπως αναστολή ανάπτυξης όγκου και πρόκληση απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Επίσης βελτιώνουν τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων και μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων. (He, X., Yang, F., & Huang, X. A., 2021).

1.5.8 Ξανθόνη

Η ξανθόνη είναι ένα αρωματικό οξυγονωμένο ετεροκυκλικό μόριο, με ικρίωμα διβενζο-γ-πιρόνης, γνωστό ως 9H-ξανθενο-9-όνη, με μοριακό τύπο $C_{13}H_8O_2$. Η αρίθμηση και ο χαρακτηρισμός των δακτυλίων Α και Β προέρχονται από τις βιοσυνθετικές πορείες για τις ενώσεις από ανώτερα φυτά, με τον δακτύλιο Α (άνθρακες 1-4) να προέρχεται από οξικό ενώ η πορεία σικιμικού οξέος δίνει τον δακτύλιο Β (άνθρακες 5-8) (Pinto, Madalena MM, et al., 2021).



Εικόνα 10. Βασική δομή Ξανθόνης

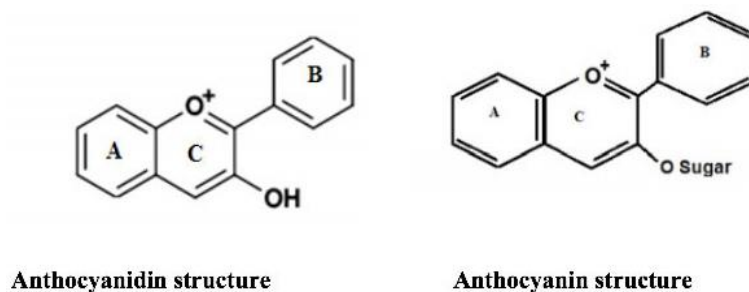
(Πηγή : Pinto, Madalena MM, et al., 2021).

Οι ξανθόνες καθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή τον μετριασμό διαφόρων χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Pinto, Madalena MM, et al., 2021).

1.6 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι μια κατηγορία φυσικών υδατοδιαλυτών χρωστικών που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών όπου συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και αποθηκεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα χυμοτόπια. Είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση, δεν βρίσκονται μόνο στα χρωματιστά πέταλα των ανθέων αλλά και στις ρίζες, τους μίσχους, τους κονδύλους, τα φύλλα, τους καρπούς και τους σπόρους. Αυτός ο τύπος χρωστικής έχει ισχυρή απορρόφηση στην ορατή από την υπεριώδη ακτινοβολία περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας των κόκκινων-μπλε χρωμάτων και των παραγώγων τους στο φυτικό βασίλειο. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι δευτερεύουσας σημασίας, αμέσως μετά τις χρωστικές της χλωροφύλλης. Οι ανθοκυανίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασπορά των σπόρων, στην επικονίαση, στην ανάπτυξη των φυτικών οργάνων, αλλά και στην προσαρμογή τους σε διάφορες αλλαγές βιοτικών (προσβολών από παθογόνα) και αβιοτικών (ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών ουσιών, φως υψηλής έντασης). Λόγω της χημικής τους δομής, με κεντρικό πυρήνα με τη μορφή κατιόντος 2-φαινυλοβενζοπυρυλίου ή φλαβυλίου, οι ανθοκυανίνες μπορούν να ταξινομηθούν ως πολυφαινόλες και δευτερογενείς μεταβολίτες (Enaru, Bianca, et al., 2021).

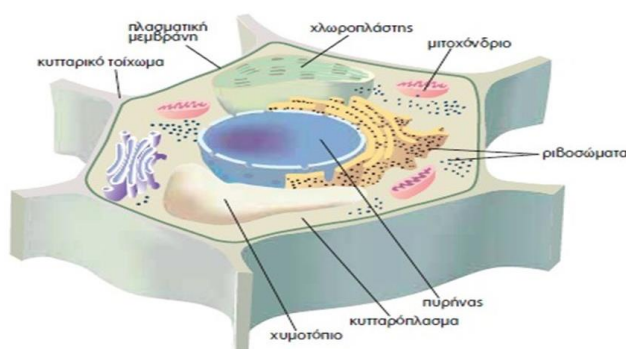
Οι ανθοκυανίνες αποτελούνται από ένα μόριο ανθοκυανιδίνης που συνήθως γλυκοζυλιώνεται με ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρου. Το τμήμα αγλυκόνης του μορίου ονομάζεται ανθοκυανιδίνη. Η χρωματική ένταση των ανθοκυανινών ενισχύεται όταν η ανθοκυανιδίνη είναι σε μορφή κατιόντος φλαβυλίου, κάτι που συμβαίνει όταν το μόριο πρωτονιώνεται. Σε αυτή τη μορφή, το μόριο έχει θετικό φορτίο, το οποίο το καθιστά πιο σταθερό και ικανό να αλληλεπιδρά πιο έντονα με άλλα μόρια στο περιβάλλον του, όπως άλλες ανθοκυανίνες ή πρωτεΐνες. Το ενισχυμένο αποτέλεσμα συντονισμού συμβάλλει επίσης στη σταθερότητα της μορφής κατιόντος φλαβυλίου και στην ένταση του παραγόμενου χρώματος.



Εικόνα 11. Χημική δομή ανθοκυανιδίνης και ανθοκυανίνης

(Πηγή εικόνας : DEVEOĞLU, O., & KARADAĞ, R., 2019)

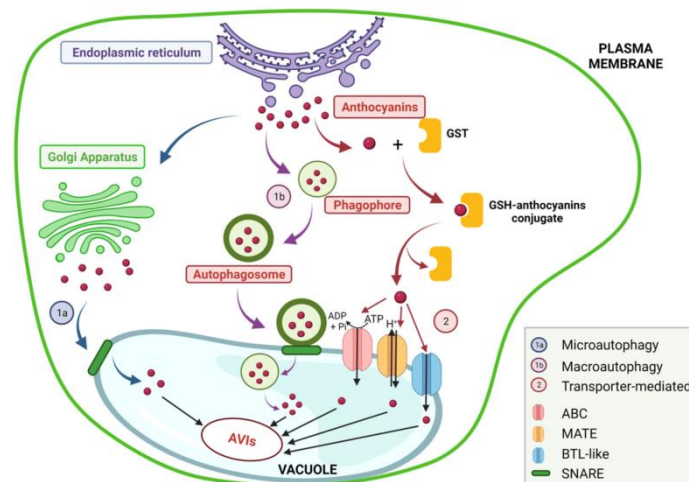
Έχει παρατηρηθεί ότι σε ορισμένα φυτά οι ανθοκυανίνες συγκεντρώνονται σε μικρά σωματίδια, σχηματίζοντας σφαιρίδια στα χυμοτόπια ορισμένων ιστών. Αυτά τα σωματίδια ονομάζονται «ανθοκυανοπλάστες», αν και αυτή η ονομασία έχει εγκαταλειφθεί και πλέον ονομάζονται χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (Anthocyanic Vacuolar Inclusions – AVIs). Οι ανθοκυανοπλάστες έχουν αναφερθεί σε περισσότερα από 70 είδη σε 33 οικογένειες αγγειόσπερμων. Οι ανθοκυανίνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, αλλά μεταφέρονται ενεργά από έναν αριθμό μεταφορέων μέσω του τονοπλάστη στο χυμοτόπιο ή σε κυστίδια που στη συνέχεια αδειάζουν στο χυμοτόπιο. Οι ανθοκυανοπλάστες μπορούν να συγχωνευθούν για να σχηματίσουν μεγάλα κυστίδια που περιέχουν ανθοκυανίνες που μπορεί να είναι κυτταροπλασματικά ή χυμοτοπιώδη. Αυτά τα έγκλειστα μπορούν να βρεθούν σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των πετάλων, και μπορούν να επηρεάσουν την ένταση του χρώματος και τη διακύμανση των ανθέων. Στο *Eustoma grandiflorum*, για παράδειγμα, τα χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης βρέθηκαν να είναι υπεύθυνα για τοπική χρωματική διακύμανση στα μωβ άνθη, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται πιο μπλε σε ορισμένες περιοχές των πετάλων (Kallam, Kalyani, et al., 2017).



Εικόνα 12. Φυτικό κύτταρο

(Πηγή εικόνας : Biology.biologia.gr)

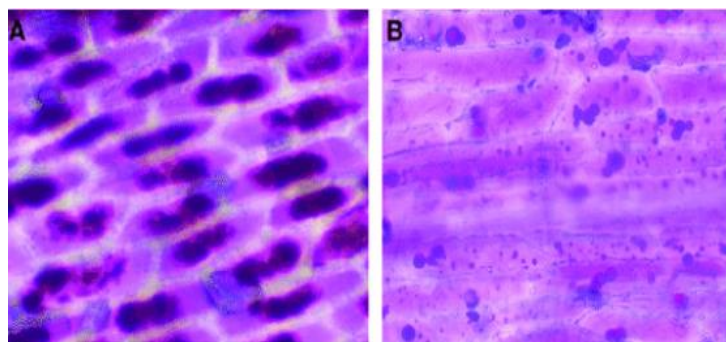
Τα χυμοτοπιακά έγκλειστα ανθοκυανίνης (AVI) είναι μοναδικές δομές που αποτελούνται από ένα στρώμα το οποίο περιέχει ένα μείγμα πρωτεϊνών, όπου συνδέονται οι ανθοκυανίνες. Σε αντίθεση με τις ανθοκυανίνες στους περιβάλλοντες ιστούς, αυτά τα σωματίδια δεν περιβάλλονται από μεμβράνη και είναι αδιάλυτα στα περισσότερα υδατικά διαλύματα, ακόμη και με τη χρήση ήπιων απορρυπαντικών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες εγκλεισμού διαφέρουν από τις ανθοκυανίνες που υπάρχουν στον χυμοτόπο χυμό. Επιπλέον, οι συν-χρωστικές φλαβονόλες που αλληλεπιδρούν με τις ανθοκυανίνες του χυμοτοπικού χυμού δεν ανιχνεύθηκαν στα εγκλείσματα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα AVI μπορεί να έχουν μοναδικό ρόλο στον προσδιορισμό του χρώματος και της έντασης της μελάγχρωσης των ανθέων.



Εικόνα 13. Απεικόνιση των πορειών μεταφοράς των ανθοκυανινών μετά την βιοσύνθεση από το ΕΔ στα χυμοτόπια

(Πηγή εικόνας : Nistor, Madalina, et al., 2022)

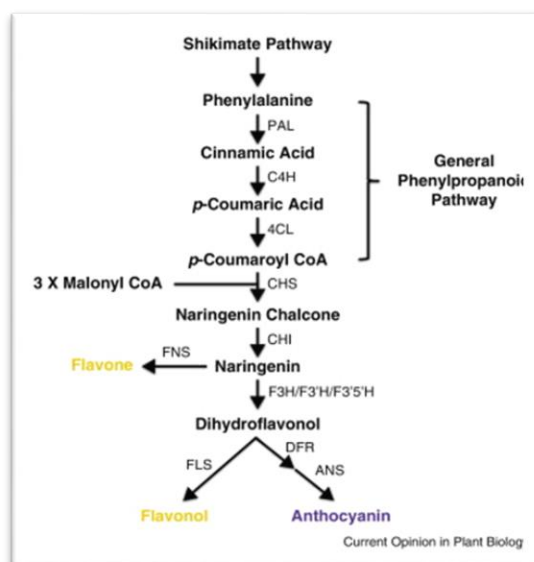
Τα χυμοτοπικά έγκλειστα έχουν όντως βρεθεί σε διάφορα είδη φυτών, όχι μόνο στο *Eustoma grandiflorum*. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτά τα έγκλειστα έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στη διαμόρφωση του χρώματος, παρόμοια με αυτό που παρατηρήθηκε στο *Eustoma grandiflorum*. Για παράδειγμα, μια μελέτη των μωβ φύλλων του φυτού *Oxalis triangularis* έδειξε ότι τα χυμοτοπικά έγκλειστρα ανθοκυανίνης ήταν υπεύθυνα για τη διαμόρφωση του μπλε-πράσινου χρώματος. Ομοίως, στα μωβ-μαύρα άνθη του φυτού *Eschscholzia californica*, οι χυμοτοπικές ανθοκυανίνες βρέθηκαν να είναι υπεύθυνες για τις διακυμάνσεις στην ένταση του χρώματος και την απόχρωση διαφορετικών τμημάτων του άνθους. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα έγκλειστρα χυμοτοπικών ανθοκυανινών μπορεί να είναι ένας κοινός μηχανισμός για την επίτευξη χρωματικής διαμόρφωσης σε διάφορα είδη φυτών.



Εικόνα 14. Συσσώρευση ανθοκυανίνης και σύνθεση AVI

(Πηγή εικόνας : Kallam, Kalyani, et al., 2017)

Οι ανθοκυανίνες συντίθενται μέσω της πορείας του φαινυλοπροπανοειδούς, η οποία ξεκινά με τη φαινυλαλανίνη και οδηγεί στην παραγωγή μιας ποικιλίας δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των λιγνινών και άλλων ενώσεων. Η σύνθεση των ανθοκυανινών ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων, ενζύμων και πορειών σηματοδότησης που ανταποκρίνονται σε αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στα άνθη, η σύνθεση ανθοκυανίνης προκαλείται συχνά από το φως, ιδιαίτερα στις μπλε και υπεριώδεις περιοχές του φάσματος. Η χωρική και χρονική ρύθμιση της σύνθεσης της ανθοκυανίνης είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή διαμόρφωση και χρωματισμό των οργάνων των φυτών, η οποία είναι απαραίτητη για την προσέλκυση επικονιαστών και τη διασφάλιση της αναπαραγωγικής επιτυχίας (Δ. Χαλκίδης, 2019).



Εικόνα 15. Βιοσύνθεση των ανθοκυανινών

(Πηγή εικόνας : Zhang, Y., Butelli, E., & Martin, C., 2014)

Δομικά, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών πολυδροξυ- και πολυμεθοξυ- παραγώγων αλάτων 2-φαινυλοβενζοπυριλίου και αποτελούνται από μια αγλυκόνη που ονομάζεται ανθοκυανιδίνη και ένα κατάλοιπο υδατάνθρακα που μπορεί να είναι γλυκόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ραμνόζη. Αυτά τα υπολείμματα υδατανθράκων συνδέονται γενικά με τον σκελετό της ανθοκυανιδίνης μέσω της C3-υδροξυλομάδας στον δακτύλιο C. Τα οργανικά οξέα μπορούν να προστεθούν στα τμήματα σακχάρου και έτσι λαμβάνει χώρα η ακυλίωση της αρχικής δομής. Οι πιο κοινές ενώσεις ακυλίωσης περιλαμβάνουν αρωματικά οξέα όπως π-κουμαρικό, σιναπικό, γαλλικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ, αλλά και μια σειρά από

αλειφατικά οξέα όπως το μηλικό, το ηλεκτρικό, το οξαλικό, το τρυγικό και το οξικό οξύ. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η δομή τα καθιστά εξαρτημένα από τη σύνθεση και τις συνθήκες του διαλύματος στο οποίο διαλύονται (Enaru, Bianca, et al., 2021).

Επιπλέον, οι ανθοκυανίνες μπορούν να πραγματοποιούν αλληλεπιδράσεις με άλλες ενώσεις αλλά και μεταξύ τους, όπου επηρεάζονται τόσο το χρώμα όσο και η δομική τους ισορροπία. Με αυτόν τον τρόπο, λαμβάνεται μια κατηγορία ενώσεων που περιλαμβάνει περισσότερα από 700 διαφορετικά είδη ανθοκυανιδινών, αλλά μόνο 6 από αυτές (κυανιδίνη, πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη) βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% όλων των ανθοκυανινών που έχουν εντοπιστεί μέχρι τώρα. Αυτές οι 6 ανθοκυανιδίνες βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά σε διάφορα ποσοστά, για παράδειγμα: 50% κυανιδίνη, 12% στην περίπτωση της πελαργονιδίνης, δελφινίνης, πετουνιδίνης και 7% για την πεονιδίνη και τη μαλβιδίνη. (Enaru, Bianca, et al., 2021).

Οι ανθοκυανίνες προστατεύουν τα φυτά από πλεονάζουσα ηλιακή ακτινοβολία. Η παραγωγή ανθοκυανίνης προκαλείται επίσης υπό συνθήκες στρες ή μόλυνση από παθογόνα και μπορεί να χρησιμεύσει για την προστασία των φυτών από οξειδωτικές βλάβες όπως αυτή που προκαλείται από υψηλή ακτινοβολία όταν η ικανότητα δέσμευσης άνθρακα είναι χαμηλή. Οι ανθοκυανίνες προστατεύουν τους φωτοσυνθετικούς ιστούς απορροφώντας το φως στο ορατό εύρος, μειώνοντας έτσι το στρες (Zhang, Y., Butelli, E., & Martin, C., 2014).

Πιο αναλυτικά, οι ανθοκυανίνες απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία μέσω των χρωμοφώρων ομάδων τους, οι οποίες περιλαμβάνουν ομάδες υδροξυλίου και καρβονυλίου. Όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, αυτές οι ομάδες χρωμοφώρων στις ανθοκυανίνες υφίστανται μια φωτοχημική αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της υπεριώδους ακτινοβολίας σε θερμότητα. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως φωτοπροστασία ή φωτοπροστασία με διαλογή. Απορροφώντας την υπεριώδη ακτινοβολία και μετατρέποντάς την σε θερμότητα, οι ανθοκυανίνες συμβάλλουν στην προστασία των φυτικών κυττάρων από τις βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει φωτοοξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αντιδραστικών οντοτήτων οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) που μπορούν να βλάψουν τα φυτικά κύτταρα και το DNA. Με την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας, οι ανθοκυανίνες μπορούν να μειώσουν την ποσότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας που φθάνει στα φυτικά κύτταρα και επομένως να μειώσουν τη δημιουργία ROS.

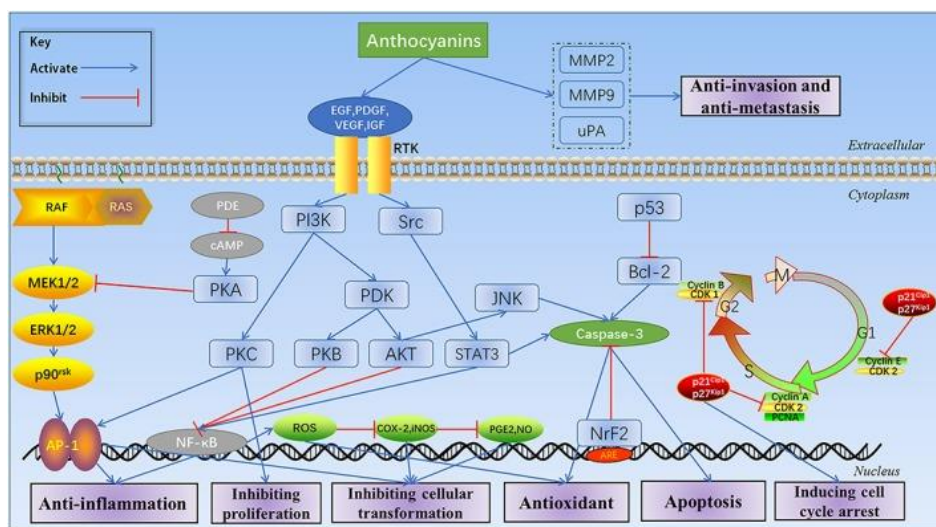
Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τις ανθοκυανίνες είναι μια παροδική διεργασία που συμβαίνει γρήγορα και η μετατροπή της υπεριώδους ακτινοβολίας σε θερμότητα συμβαίνει πιο γρήγορα από τη φωτοαποικοδόμηση των ανθοκυανινών. Ως εκ τούτου, βραχυπρόθεσμα, οι ανθοκυανίνες μπορούν να παρέχουν αποτελεσματική προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και η φωτοαποικοδόμηση των ανθοκυανινών είναι μια πιο αργή διεργασία που συμβαίνει με την πάροδο του χρόνου.

Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα των ανθοκυανινών είναι η εξαιρετικά χαμηλή σταθερότητά τους, η οποία επηρεάζεται εύκολα από ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων όπως:

- Η σχετική υγρασία
- Το φως
- Το pH
- Η θερμοκρασία
- Τα σάκχαρα (ακυλιωμένα και μη)
- Η βιταμίνη C
- Τα επίπεδα οξυγόνου
- Το διοξείδιο του θείου ή τα θειώδη άλατα
- Τα ένζυμα
- Οι συν-χρωστικές ουσίες

Έτσι, αυτοί οι παράγοντες και διαδικασίες θα είναι σε θέση να καθορίσουν τις αλλαγές στη συγκέντρωση και τη βιοδραστικότητα των ανθοκυανινών (Enaru et al., 2021).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις τους, οι οποίες μπορεί να βοηθήσουν στη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο διαβήτης τύπου II.



Εικόνα 16. Μηχανισμός δράσης ανθοκυανινών

(Πηγή εικόνας : Lin, Bo-Wen, et al., 2017)

Οι ανθοκυανίνες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, ιδιαίτερα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά

τους να διαταράσσουν τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες και να αναστέλλουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των βακτηριακών κυττάρων.

Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης προτείνει ότι οι ανθοκυανίνες μπορεί να έχουν ευεργετική επίδραση στη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη, ενδεχομένως βελτιώνοντας τη ροή του αίματος στον εγκέφαλο και μειώνοντας τη φλεγμονή.

Συνολικά, ενώ απαιτείται περισσότερη έρευνα για την πλήρη κατανόηση των πλεονεκτημάτων των ανθοκυανινών για την υγεία, τα μέχρι στιγμής στοιχεία δείχνουν ότι μπορεί να έχουν ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία μιας σειράς χρόνιων ασθενειών.

1.6.1 Χρώμα ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες είναι εν γένει ασταθείς ενώσεις. Το χρώμα τους εξαρτάται και από αρκετούς εξωγενείς παράγοντες όπως προαναφέραμε. Το χρώμα των ανθοκυανινών μπορεί επίσης να επηρεαστεί από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η παρουσία άλλων ενώσεων, καθώς και το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Για παράδειγμα, το χρώμα των αλάτων φλαβυλίου μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το αν είναι διαλυμένα σε πρωτικό (κόκκινο χρωματισμό), δηλαδή πολικούς διαλύτες που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου και να διαλύουν άλατα, όπως το νερό ή μη πρωτικό διαλύτη (κίτρινο χρωματισμό) (Δ. Χαλκίδης, 2019).

1.6.1.1 Υγρασία

Η υγρασία μπορεί να αποικοδομήσει τις ανθοκυανίνες, ειδικά σε συνθήκες υψηλής υγρασίας ή όταν έρχεται σε επαφή με το νερό. Οι ανθοκυανίνες είναι ευαίσθητες στην αποικοδόμηση με υδρόλυση, η οποία περιλαμβάνει τη διάσπαση των χημικών δεσμών από τα μόρια του νερού. Παρουσία υγρασίας, οι ανθοκυανίνες μπορούν να υποστούν υδρόλυση για να σχηματίσουν άχρωμα ή καφέ χρώματος προϊόντα αποικοδόμησης, που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της έντασης και της ποιότητας του αρχικού των χρωμάτων. Αυτή η διεργασία αποικοδόμησης μπορεί να επιταχυνθεί με την παρουσία θερμότητας, φωτός ή οξυγόνου.

1.6.1.2 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα μπορούν να αντιδράσουν με τις ανθοκυανίνες σε μια διεργασία που ονομάζεται αντίδραση *Maillard*, η οποία περιλαμβάνει το μη ενζυμικό μαύρισμα των σακχάρων και των αμινοξέων ή των πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης *Maillard*, η καρβονυλική ομάδα ενός αναγωγικού σακχάρου αντιδρά με την

αμινομάδα ενός αμινοξέος ή πρωτεΐνης, σχηματίζοντας μια σύνθετη σειρά χημικών αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό καφέ χρωστικών και την αποικοδόμηση των ανθοκυανινών. Αυτή η διεργασία συχνά επιταχύνεται από υψηλές θερμοκρασίες και συνθήκες χαμηλού pH. Εκτός από την αντίδραση *Maillard*, τα σάκχαρα μπορούν επίσης να αντιδράσουν με τις ανθοκυανίνες μέσω άλλων χημικών αντιδράσεων, όπως η υδρόλυση και η οξείδωση, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των ανθοκυανινών.

1.6.1.3 Θερμοκρασία

Ένας άλλος παράγοντας που φαίνεται να επιδρά στο χρώμα του άνθος είναι η θερμοκρασία όπου μπορεί να έχει αντίκτυπο στη σταθερότητα και το χρώμα των ανθοκυανινών. Οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν αποδόμηση, γλυκοζυλίωση και πολυμερισμό των ανθοκυανινών, οδηγώντας σε απώλεια χρωστικής και μειωμένη σταθερότητα. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες που αποθηκεύονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα σε ακυλιωμένη μορφή, έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε σύγκριση με τις μη ακυλιωμένες ανθοκυανίνες. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η διαχείριση της θερμοκρασίας θα μπορούσε να είναι σημαντική για τη διατήρηση της σταθερότητας και του χρώματος των ανθοκυανινών, ιδιαίτερα στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών όπου οι ανθοκυανίνες χρησιμοποιούνται συχνά ως φυσικές χρωστικές. Οι ανθοκυανίνες είναι ευαίσθητες σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το φως, το οξυγόνο και ενζυμική δραστηριότητα. Οι πιο σκληρές συνθήκες για την πλήρη αποικοδόμηση των ανθοκυανινών θα ήταν ένας συνδυασμός αυτών των παραγόντων που θα επιτάχυναν την αποικοδόμησή τους.

Ωστόσο, γενικά, οι ανθοκυανίνες είναι σχετικά σταθερές σε θερμοκρασίες κάτω των 70°C (158°F) και η σταθερότητά τους μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Σε υψηλές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα πάνω από 80°C (176°F), οι ανθοκυανίνες μπορούν να υποστούν διάφορες αντιδράσεις αποικοδόμησης, όπως υδρόλυση, οξείδωση και συμπύκνωση, που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια χρώματος, αλλαγές γεύσης και αποικοδόμηση θρεπτικών συστατικών (Liu, Ya, et al., 2018).

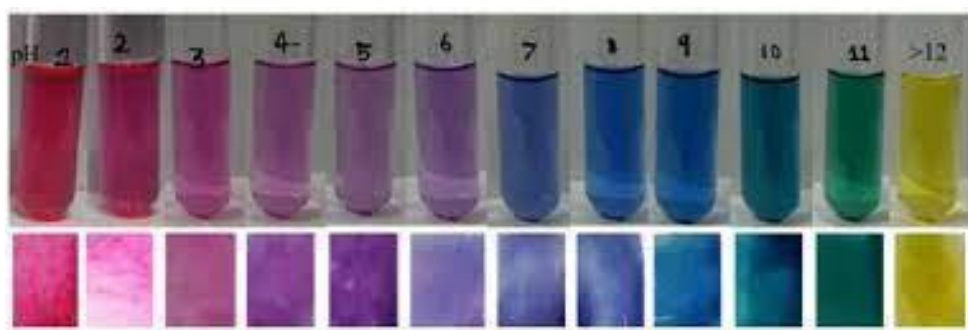
Ο ρυθμός αποικοδόμησης της ανθοκυανίνης μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τη διάρκεια της έκθεσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, μια μελέτη διαπίστωσε ότι η θέρμανση ενός συμπυκνώματος χυμού μύρτιλου στους 85°C (185°F) για 2 ώρες είχε ως αποτέλεσμα σημαντική απώλεια ανθοκυανινών, ενώ η θέρμανση στην ίδια θερμοκρασία για μόνο 30 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα πολύ μικρότερη μείωση της ανθοκυανίνης.

1.6.1.4 pH

Το χρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται από το pH :

- Σε **pH < 2,5**, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται με τη μορφή του κατιόντος φλαβυλίου (κόκκινο – πορτοκαλί χρώμα) που τις καθιστά πολύ διαλυτές στο νερό και αυτή η μορφή είναι επίσης υπεύθυνη για την παραγωγή κόκκινων και μοβ χρωμάτων.
- Σε **pH 2,5 – 3,5** οι ανθοκυανίνες υπάρχουν σε μορφή κατιόντος φλαβυλίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για το κόκκινο και ροζ χρώμα
- Όταν το pH αυξάνεται μεταξύ 4 - 6, επικρατεί βιολετί ανυδροβάση
- Σε **pH > 7**, σχηματίζονται μπλε ανιόντα βάσης και οι ανθοκυανίνες αποικοδομούνται

Σε pH από 3 έως 4, οι ανθοκυανίνες είναι πιο σταθερές και υπάρχουν σε μορφή κατιόντος φλαβυλίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα. Αυτό είναι το πιο κοινό χρώμα που σχετίζεται με τροφές που περιέχουν ανθοκυανίνη, όπως οι φράουλες, τα σμέουρα και τα κεράσια. Σε αυτό το εύρος pH, η μορφή κατιόντος φλαβυλίου της ανθοκυανίνης είναι η κυρίαρχη μορφή και το κόκκινο χρώμα είναι πιο έντονο. Ωστόσο, μικρές διακυμάνσεις στο επίπεδο του pH μπορούν επίσης να προκαλέσουν ανεπαίσθητες αλλαγές στο χρώμα των ανθοκυανινών, οδηγώντας σε μια σειρά αποχρώσεων του κόκκινου και του ροζ.



Εικόνα 17. Χρώμα ανθοκυανινών με βάση το pH (1 – 14)

(Πηγή εικόνας : Abedi-Firoozjah, Reza, et al., 2022)

Ωστόσο, οι τέσσερις μορφές ανθοκυανινών (κατιόν φλαβυλίου, κινουειδής βάση, ψευδοβάση καρβινόλης και χαλκόνη) μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα εύρος pH 4-6, η ισορροπία αυτών των μορφών διατηρείται από το κατιόν φλαβυλίου. Εν ολίγοις, η

σταθερότητα των ανθοκυανινών αυξάνεται με την αύξηση της μεθυλίωσης και μειώνεται από τον αυξανόμενο αριθμό ομάδων υδροξυλίου στον δακτύλιο Β των ανθοκυανιδινών (Enaru, Bianca, et al., 2021).

1.6.1.5 Συν – χρωματισμός

Το χρώμα των ανθοκυανινών επηρεάζεται και από το φαινόμενο της αλληλεπίδρασής τους με συν – χρωματισμό (co-pigmentation).

Υπάρχουν 3 τύποι συν - χρωματισμού :

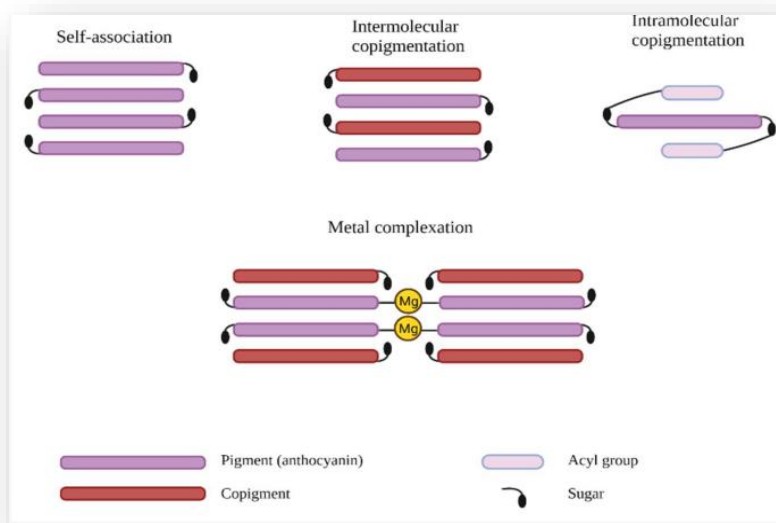
- Μεταλλική αλληλεπίδραση
- Αυτοσύνδεση
- Ενδομοριακή και διαμοριακή συνμετάγγχρωση

Οι χρωστικές ανθοκυανίνης μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλες άχρωμες οργανικές ενώσεις ή μεταλλικά ιόντα για να σχηματίσουν σύνθετες δομές, με αποτέλεσμα αλλαγές στις φασματικές τους ιδιότητες και στην ένταση του χρώματος. Αυτές οι άχρωμες ενώσεις, γνωστές ως συχρωστικές, μπορεί να περιλαμβάνουν φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, πολυσακχαρίτες, μέταλλα, ακόμη και άλλες ανθοκυανίνες. Όταν αναμιγνύονται με διαλύματα ανθοκυανίνης, οι συχρωστικές μπορούν να σταθεροποιήσουν τις χρωστικές και να προκαλέσουν αύξηση της απορρόφησης (γνωστό ως υπερχρωμικό φαινόμενο) και μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, με αποτέλεσμα μια πιο μπλε απόχρωση (γνωστή ως βαθοχρωμική μετατόπιση).

Η συν-χρωστική είναι μια διεργασία όπου οι χρωστικές αλληλεπιδρούν με άλλες άχρωμες οργανικές ενώσεις ή μεταλλικά ιόντα, με αποτέλεσμα πολύπλοκες δομές που μπορούν να ενισχύσουν την ένταση του χρώματος και να προκαλέσουν φασματικές αλλαγές. Η σύγχρωση οφείλεται σε αλληλεπίδραση μεταξύ π-δεσμών. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο εμφανές σε ασθενώς όξινο pH, όταν οι ανθοκυανίνες είναι άχρωμες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικών και συν-χρωστικών μπορεί να συμβεί ενδομοριακά ή διαμοριακά, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ανθοκυανινών. Οι φαινολικές ενώσεις όπως οι φλαβόνες ή οι φλαβονόλες συχνά δρουν ως συν-χρωστικές για τις ανθοκυανίνες και η αλληλεπίδραση εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος και η συγκέντρωση χρωστικών και συν-χρωστικών, το pH και η θερμοκρασία. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο όταν οι ανθοκυανίνες φέρουν πλευρικές αρωματικές ομάδες (Δ. Χαλκίδης, 2019).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ανθοκυανινών και συν-χρωστικών μπορεί να συμβεί τόσο με το ιόν φλαβυλίου όσο και με τη βάση ανυδρίτη, με αποτέλεσμα ένα μπλε-μοβ χρώμα. Η αλληλεπίδραση δεν είναι σε στοιχειομετρική αναλογία και μπορεί να συμβεί ενδομοριακά ή διαμοριακά. Έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση μπορεί να

προκαλείται από μια υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των αρωματικών πυρήνων της ανθοκυανίνης και της συνχρωστικής, πιθανώς ενισχυμένη από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των σακχάρων.



Εικόνα 18. Τύποι συγχρωματισμού

(Πηγή εικόνας : Enaru, Bianca, et al., 2021)

Οι ανθοκυανίνες είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρωματικού πυρήνα και των πλευρικών ομάδων τους, όπως τα παράγωγα κινναμμικού οξέος (π-κουμαρικό οξύ και το καφεϊκό οξύ) και οι ομάδες ακυλίου. Οι πολυακυλιωμένες ανθοκυανίνες, ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι είναι ασυνήθιστα σταθερές σε ασθενώς όξινο pH, πιθανώς λόγω της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης μεταξύ του αρωματικού πυρήνα και των ομάδων ακυλίου. Αυτή η σταθεροποίηση μπορεί να εξηγήσει γιατί ορισμένες ανθοκυανίνες είναι σε θέση να διατηρήσουν το χρώμα τους σε διάφορα περιβάλλοντα.

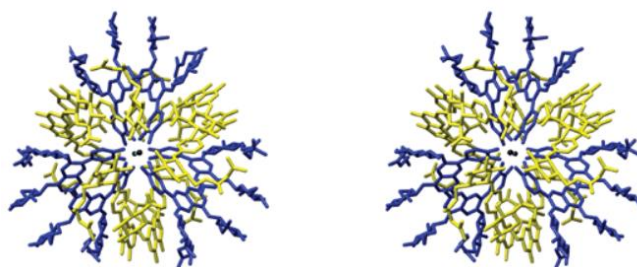
Οι αρωματικές ομάδες τοποθετούνται η μία δίπλα στην άλλη, δημιουργώντας μια πολυεπίπεδη δομή που μοιάζει με σάντουιτς. Αυτή η διάταξη προστατεύει την υποκείμενη ουσία από την ενυδάτωση. Επιπλέον, οι ανθοκυανίνες που περιέχουν μηλονικό είναι πιο ανθεκτικές στους χημικούς μετασχηματισμούς σε σύγκριση με άλλες ανθοκυανίνες. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ικανότητα των μηλονικών ομάδων να εξουδετερώνουν τις όξινες ιδιότητες του μορίου της ανθοκυανίνης. Ορισμένοι ειδικοί έχουν επίσης προτείνει ότι το μπλε χρώμα που παρατηρείται στη χρωστική ουσία γεντιοδελφίνη (gentiodelphin) οφείλεται σε σταθεροποίηση που προκύπτει από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.

Ένα άλλο παράδειγμα σταθεροποίησης μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μπορεί να εμφανιστεί όταν τα χρωμοφόρα ανθοκυανίνης και φλαβονών συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς. Αυτή η σύνδεση βοηθά στη σταθεροποίηση του

χρώματος της ένωσης ενώ ορισμένες ενώσεις σταθεροποιούνται τόσο με ενδομοριακές όσο και με διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η σταθεροποίηση προκύπτει από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών μορίων στην ίδια ένωση καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών μορίων στην ίδια ή γειτονική ένωση.(Eneanu, Bianca, et al., 2021).Οι ανθοκυανίνες είναι ικανές να σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, προκαλώντας υπερμοριακές χρωστικές. Μια τέτοια κατηγορία ενώσεων είναι γνωστή ως μεταλλοανθοκυανίνες. Αυτές οι χρωστικές αναφέρονται ως αυτο-πηκτικά υπερμοριακά σύμπλοκα, που αποτελούνται από ανθοκυανίνες, φλαβόνες και ιόντα μετάλλων σε συγκεκριμένη στοιχειομετρική αναλογία.

Οι μεταλλοανθοκυανίνες συνδέονται συνήθως με τον μπλε χρωματισμό των ανθέων, αν και αυτό το φαινόμενο είναι πιο περίπλοκο και πολύπλευρο. Για παράδειγμα, η μπλε χρωστική κομμελίνη είναι ένα σύμπλοκο μεταλλοανθοκυανίνης που περιλαμβάνει μια συγκεκριμένη ανθοκυανίνη, μια συγκεκριμένη φλαβόνη και Mg^{2+} σε στοιχειομετρική αναλογία 6:6:2. Στην κομμελίνη, το ιόν μαγνησίου μπορεί να υποκατασταθεί με άλλα μεταλλικά ιόντα όπως Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} και Mn^{2+} . Το προκύπτον χρώμα της χρωστικής μπορεί να είναι μπλε ή μοβ. Σε άλλους τύπους μεταλλοανθοκυανινών, μπορούν να συμμετέχουν δύο διακριτά μεταλλικά ιόντα. Για παράδειγμα, η πρωτοκυανίνη περιέχει ιόντα Fe^{3+} και Mg^{2+} . Στην πρωτοκυανίνη, τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να αντικατασταθούν από Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Co^{3+} (στη θέση του Fe^{3+}) και Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} (στη θέση του Mg^{2+}) (Δ. Χαλκίδης, 2019).

Η υπερβολική ποσότητα σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε μπλε-μαύρο χρωματισμό στις μεταλλοανθοκυανίνες. Είναι απίθανο αυτά τα μεταλλικά ιόντα να μεταφερθούν στο χυμότοπο μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων. Αντίθετα, μπορεί να εισέλθουν στα φυτικά κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης ή να προσληφθούν από συγκεκριμένους μεταφορείς που δεν εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μεταλλοανθοκυανίνης. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο, τα μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια ανθοκυανίνης και φλαβόνης για να σχηματίσουν σύμπλοκα μεταλλοανθοκυανίνης, με αποτέλεσμα τον μπλε-μαύρο χρωματισμό.



Εικόνα 19. Κρυσταλλογραφική δομή ακτίνων X της πρωτοκυανίνης (στερεοσκοπική εικόνα)

(Πηγή εικόνας: Yoshida et al., 2009)

Τα μπλε πέταλα συχνά περιέχουν ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι λιγότερο ισχυρές από τις μεταλλοανθοκυανίνες, αλλά μπορούν να σταθεροποιηθούν σε σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα ως συνχρωστικές σε μη στοιχειομετρική αναλογία. Αυτός ο τύπος σταθεροποίησης είναι πιο συνηθισμένος από τις μεταλλοανθοκυανίνες. Αυτά τα σύμπλοκα είναι μπλε μόνο σε υδατικό διάλυμα και όχι μετά από κρυστάλλωση. Οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες ή οι φλαβονόλες μπορούν να σχηματίσουν τέτοια σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα όπως το Al^{3+} στο *Hydrangea macrophylla* (Yoshida et al., 2009).

Άλλα φλαβονοειδή αλληλεπιδρούν επίσης με μέταλλα. Για παράδειγμα, το *Tagetes patula* περιέχει φλαβονοειδή που σχετίζονται με την κερσετίνη, τα οποία δίνουν ένα ανοιχτό κίτρινο χρώμα φυσικά. Ωστόσο, όταν αλληλεπιδρούν με το χρώμιο, δίνουν ένα σκούρο πορτοκαλί χρώμα και όταν αλληλεπιδρούν με τον χαλκό, δίνουν ένα καφέ χρώμα.

1.6.1.6 Οξυγόνο

Το χρώμα των ανθοκυανινών επηρεάζεται από την παρουσία οξυγόνου. Το οξυγόνο μπορεί να επιταχύνει τη διεργασία αποικοδόμησης των ανθοκυανινών με δύο τρόπους: με έναν άμεσο οξειδωτικό μηχανισμό ή με τη δράση οξειδωτικών ενζύμων. Στην πραγματικότητα, η υψηλή θερμοκρασία και η παρουσία οξυγόνου έχουν αποδειχθεί ο πιο επιβλαβής συνδυασμός όλων των παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα αυτών των ενώσεων. Επίσης, επειδή οι ανθοκυανίνες αντιδρούν με ρίζες οξυγόνου, έχουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα, καθιστώντας τις ενώσεις αυτές ευεργετικές έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων.

1.6.1.7 Ασκορβικό οξύ

Η παρουσία ασκορβικού οξέος σε ένα περιβάλλον που περιέχει ανθοκυανίνες προκαλεί την ταχύτερη αποικοδόμησή τους και απώλεια χρώματος, υποδηλώνοντας έτσι μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μορίων.

Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους θα συνέβαινε αυτό το φαινόμενο είναι :

- Η άμεση συμύκνωση του ασκορβικού οξέος με ανθοκυανίνες ή ο σχηματισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου
- Η οξειδωτική διάσπαση του δακτυλίου πυρυλίου από υπεροξειδία
- Η απώλεια χρωστικών ανθοκυανινών από την οξειδωτική διάσπαση του δακτυλίου πυρυλίου, οφείλεται στην ικανότητα των ανθοκυανινών να δρουν ως μοριακοί ενεργοποιητές οξυγόνου, με αποτέλεσμα αυτή η αντίδραση να παράγει ελεύθερες ρίζες

1.6.1.8 Φως

Οι ανθοκυανίνες επηρεάζονται και από το φως με δύο τρόπους: Το φως απαιτείται για την παραγωγή ανθοκυανινών, αλλά επίσης επιταχύνει τη διάσπασή τους. Η ποσότητα του μοριακού οξυγόνου που υπάρχει επηρεάζει το ρυθμό διάσπασης που προκαλείται από το φως.

Όταν οι χρωστικές εκτίθενται σε φθορίζον φως, εμφανίζεται η πιο έντονη απώλεια ανθοκυανίνης. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τον προσδιορισμό των χρωμάτων πορτοκαλί, κόκκινο και μπλε σε πολλά φυτά, καθώς οι ανθοκυανίνες είναι καλοί απορροφητές του ορατού φωτός. Το χρώμα επηρεάζεται κυρίως από το μοτίβο υποκατάστασης του δακτυλίου Β της ανθοκυανίδινης σε αντίθεση με το σχήμα γλυκοζυλίωσης της δομής φλαβάνης, το οποίο επηρεάζει την παραγωγή χρώματος σε μικρότερο βαθμό.

Γενικά, οι ανθοκυανίνες είναι πιο ευαίσθητες στο φως στην γαλαζοπράσινη περιοχή του φάσματος (400-530 nm) και στην περιοχή υπεριώδους (UV) (κάτω από 400 nm). Η έκθεση σε ορατό φως στην περιοχή των 400-530 nm μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση των ανθοκυανινών με την πάροδο του χρόνου, ενώ η έκθεση στο υπεριώδες φως μπορεί να επιταχύνει την αποικοδόμηση. Η διάρκεια της έκθεσης που απαιτείται για την πρόκληση σημαντικής αποικοδόμησης των ανθοκυανινών μπορεί να ποικίλλει. Η έκθεση για αρκετές ώρες ή ημέρες, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αποικοδόμηση των ανθοκυανινών.

1.6.1.9 θειώδη και θειικά άλατα

Τα θειώδη και θειικά άλατα μπορούν να προκαλέσουν την απώλεια χρωστικής ανθοκυανίνης. Αυτός ο αποχρωματισμός προκαλείται από το σχηματισμό άχρωμων δομών παραγώγων θείου όταν αυτές οι ενώσεις θείου προστίθενται στις θέσεις 2 ή 4 των ανθοκυανινών. Μια ποσότητα διοξειδίου του θείου θα απελευθερωθεί από τις ανθοκυανίνες όταν θερμανθεί η θειούχα ένωση και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ανακτηθεί εν μέρει το συγκεκριμένο χρώμα αυτών των ενώσεων. Η οξύνιση σε χαμηλό pH αναγεννά επίσης τις ανθοκυανίνες απελευθερώνοντας SO₂. Από την άλλη, οι υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους άλατος (άνω των 10 g/kg) προκαλούν μόνιμη αποδόμηση της ανθοκυανίνης.

1.6.1.10 Ένζυμα

Τέλος, τα ένζυμα επηρεάζουν το χρώμα των ανθοκυανινών. Τα πιο συνηθισμένα ένζυμα που αποικοδομούν τις ανθοκυανίνες είναι οι γλυκοζιτάση, οι υπεροξειδάσες (οξειδάσες της φαινόλης) και οι φαινολάσες (οξειδάσες των πολυφαινόλων). Οι

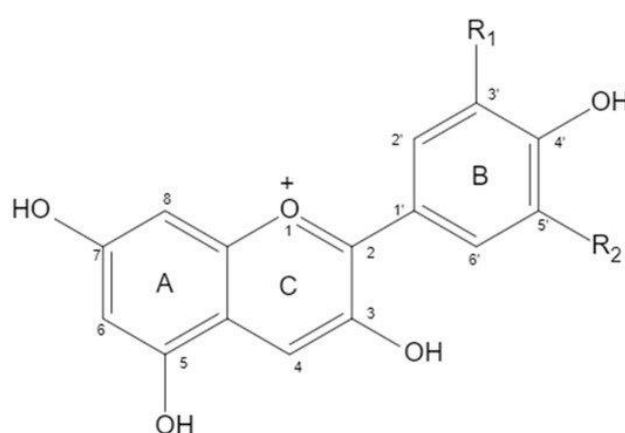
γλυκοζιτάσες επηρεάζουν άμεσα τις ανθοκυανίνες, ενώ οι υπεροξειδάσες και οι φαινολάσες έχουν έμμεσες επιδράσεις στη σταθερότητά τους. Οι γλυκοζιτάσες διασπούν τον ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του καταλοίπου σακχάρου και της αγλυκόνης μιας ανθοκυανίνης, σχηματίζεται έτσι μια ασταθής ανθοκυανιδίνη. Η οξειδάση των πολυφαινολών είναι το ένζυμο που θα καταλύει δύο τύπους αντιδράσεων: την ο-υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες και την οξείδωση των ο-διφαινολών στις ο-κινόνες παρουσία μοριακού οξυγόνου. Μετά τη δράση αυτών των ενζύμων, η διαλυτότητα των ανθοκυανινών μειώνεται και λαμβάνει χώρα ο μετασχηματισμός τους σε άχρωμες ενώσεις (Enaru, Bianca, et al., 2021).

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των ανθοκυανινών από την αποικοδόμηση υπό ακραίες συνθήκες όπως :

- **Αντιοξειδωτικά:** Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των ανθοκυανινών, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες. Παραδείγματα αντιοξειδωτικών που μπορούν να προστατεύσουν τις ανθοκυανίνες περιλαμβάνουν ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), άλφα-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και πολυφαινολικές ενώσεις
- **Χηλικοί παράγοντες:** Οι χηλικοί παράγοντες μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των ανθοκυανινών δεσμεύοντας σε μεταλλικά ιόντα που μπορούν να καταλύσουν την αποικοδόμησή τους. Παραδείγματα χηλικών παραγόντων που μπορούν να προστατεύσουν τις ανθοκυανίνες περιλαμβάνουν το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και το κιτρικό οξύ
- **Χαμηλό pH:** Οι ανθοκυανίνες είναι πιο σταθερές σε χαμηλότερα επίπεδα pH 3-4. Επομένως, τα όξινα προϊόντα διατροφής, όπως οι χυμοί φρούτων ή τα αναψυκτικά, μπορούν να προστατεύσουν τις ανθοκυανίνες από την αποικοδόμηση υπό ακραίες συνθήκες
- **Συσκευασία υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα:** Η συσκευασία τροφίμων υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα μπορεί να βοηθήσει στην προστασία των ανθοκυανινών μειώνοντας την έκθεση στο οξυγόνο και το φως
- **Χαμηλές θερμοκρασίες:** Η αποθήκευση προϊόντων τροφίμων που περιέχουν ανθοκυανίνες σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να βοηθήσει στην επιβράδυνση της αποικοδόμησης των ανθοκυανινών

1.6.2 Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών που είναι υπεύθυνες για τα ζωνηρά χρώματα πολλών φυτικών ιστών όπως τα άνθη, καρποί και τα φύλλα. Οι έξι πιο κοινές ανθοκυανιδίνες που βρίσκονται στα ανώτερα φυτά είναι η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη, η παιονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβινιδίνη. Αυτά τα μόρια διαφέρουν ως προς τον αριθμό και τη θέση των ομάδων υδροξυλίου (-OH) στη δομή τους, γεγονός που επηρεάζει το χρώμα και τη σταθερότητά τους.



Εικόνα 20. Βασική δομή ανθοκυανιδίνης

(Πηγή εικόνας : [Encyclopedia MDPI](#))

Οι ερευνητές έχουν προτείνει μια υπόθεση που προτείνει μια συσχέτιση μεταξύ του βαθμού υδροξυλίωσης της ανθοκυανιδίνης και του χρώματος της προκύπτουσας ανθοκυανίνης. Αυτή η υπόθεση υποδηλώνει ότι όσο περισσότερες υδροξυλομάδες έχει μια ανθοκυανιδίνη, τόσο πιο πιθανό είναι να σχηματίσει μια σταθερή, κόκκινου χρώματος ανθοκυανίνη. Αντίθετα, οι ανθοκυανιδίνες με λιγότερες υδροξυλομάδες τείνουν να παράγουν λιγότερο σταθερές ανθοκυανίνες που έχουν περισσότερο μπλε ή μοβ χρώμα.

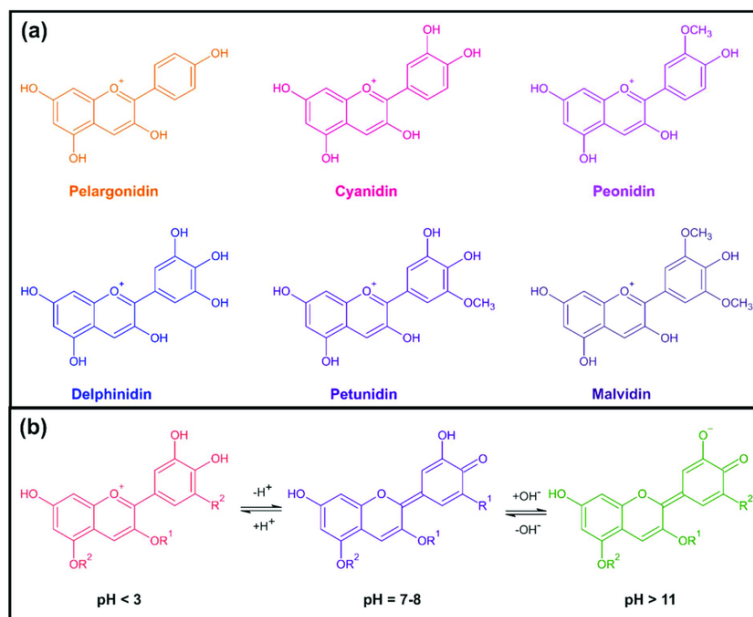
Οι περισσότερες ανθοκυανίνες παράγονται από 3 βασικούς τύπους ανθοκυανιδίνης που βασίζονται στην πελαργονιδίνη, στην κυανιδίνη και στη δελφινιδίνη. Εν γένει αυξημένος βαθμός υδροξυλίωσης του β-δακτυλίου οδηγεί σε περισσότερο μπλε απόχρωση στην ανθοκυανίνη, η οποία δίνει την κύρια χρωματική απόχρωση εφ' όσον είναι η κύρια ανθοκυανίνη που συσσωρεύεται στον ιστό (Δ. Χαλκίδης, 2019).

Πίνακας 1 : Δομές των έξι κοινών ανθοκυανιδινών στα φυτά

Ανθοκυανιδίνη	-R1 (3' C)	-R2 (5' C)	-R3 (3 C)
Πελαργονιδίνη	H	H	H
Κυανιδίνη	OH	H	H
Παιονιδίνη	OCH ₃	H	H
Δελφινιδίνη	OH	OH	H
Πετουνιδίνη	OCH ₃	OH	H
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃	H

Τα χρώματα των ανθοκυανινών καθορίζονται από τον τύπο και τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο μόριο της ανθοκυανιδίνης. Στη φύση, η κυανιδίνη βρίσκεται κυρίως σε μούρα και άλλα κόκκινα λαχανικά, επειδή εμφανίζεται με τη μορφή μιας κόκκινης-μωβ χρωστικής ουσίας, παρόμοιας με το χρώμα φούξια (magenta).

Η πελαργονιδίνη εμφανίζεται ελεύθερα με τη μορφή κόκκινης χρωστικής αλλά δίνει στα λουλούδια μια πορτοκαλί απόχρωση και στους καρπούς ένα κόκκινο χρώμα. Η δελφινιδίνη εμφανίζεται ως μπλε-κοκκινωπή ή μωβ χρωστική ουσία στο φυτό, που οδηγεί στο μπλε χρώμα των λουλουδιών. Η πετουνιδίνη είναι μια υδατοδιαλυτή μεθυλιωμένη ανθοκυανίνη, σε σκούρο κόκκινο ή μωβ χρώμα, η οποία βρίσκεται συχνά στα φραγκοστάφυλα και τα μωβ άνθη. Η πεονιδίνη είναι μια άλλη μεθυλιωμένη ανθοκυανίνη, η οποία εμφανίζεται σε χρώμα φούξια, που επίσης βρίσκεται σε αφθονία στα μούρα, στα σταφύλια και στα κόκκινα κρασιά. Η μαλβιδίνη είναι μια Ο-μεθυλιωμένη ανθοκυανίνη, η οποία εμφανίζεται ως μωβ χρωστική ουσία και καθορίζει το μπλε χρώμα ορισμένων λουλουδιών, αλλά είναι η κύρια χρωστική ουσία στα κόκκινα κρασιά. Έτσι, οι ανθοκυανιδίνες κυανιδίνη, πελαργονιδίνη και δελφινιδίνη βρίσκονται συχνά στους καρπούς, ενώ στα άνθη οι κυρίαρχες ανθοκυανιδίνες είναι η πεονιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη. Όταν υπάρχουν πολλαπλοί τύποι ανθοκυανιδινών σε έναν ιστό, η συνύπαρξή τους οδηγεί σε ένα ενδιάμεσο χρωματικό αποτέλεσμα. Ο συνδυασμός διαφορετικών τύπων ανθοκυανιδινών μπορεί να οδηγήσει σε ένα μεγάλο φάσμα χρωμάτων, από ροζ και μωβ έως μπλε και κόκκινο.



Εικόνα 21. (α) Οι 6 κύριες ανθοκυανιδίνες και (β) η δομή των ανθοκυανιδινών που αλλάζει με το pH. Το χρώμα με το οποίο απεικονίζονται οι δομές στο σχήμα μοιάζει με το πραγματικό τους.

(Πηγή εικόνας : Kossyvaki, Despoina, et al., 2022)

Συνοπτικά, το χρώμα των ανθοκυανινών καθορίζεται από τον τύπο και τον αριθμό των υδροξυλομάδων στο μόριο της ανθοκυανιδίνης. Η συνύπαρξη διαφορετικών τύπων ανθοκυανινών σε έναν ιστό μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων (Ng and Smith, 2016).

ΜΕΡΟΣ 2

2.1 *Lunaria annua*

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα

Τάξη: Brassicales

Οικογένεια: Brassicaceae

Γένος: *Lunaria*

Είδος: *annua*

Κοινή Ονομασία: Λουνάρια



Εικόνα 22 : *Lunaria annua*

(Πηγή εικόνας : nature-and-garden.com)

Η *Lunaria annua*, συνήθως ονομάζεται το φυτό του ασημένιου δολαρίου ή φυτό τιμιότητας ή φυτό του φεγγαριού. Αυτό το φυτό είναι εγγενές στην Ευρώπη και επίσης καλλιεργείται συνήθως ως καλλωπιστικό φυτό σε κήπους. Η *Lunaria annua* είναι ένα ποώδες φυτό που μπορεί να φτάσει τα 90 εκατοστά σε ύψος και είναι συχνά διετές, που σημαίνει ότι ολοκληρώνει τον κύκλο ζωής του σε δύο χρόνια. Ο μίσχος είναι τριχωτός, όρθιος και διακλαδισμένος, ενώ τα φύλλα είναι μεγάλα, απλά, ωοειδή και καρδιοειδή (σε σχήμα καρδιάς), με τα κάτω φύλλα να έχουν μακρύ μίσχο και τα πάνω φύλλα να είναι άμισχα (χωρίς μίσχο). Τα άνθη έχουν τέσσερα σέπαλα και πέταλα και έξι στήμονες και μπορούν να είναι είτε μωβ είτε λευκά. Ο καρπός είναι ένας επίπεδος, στρογγυλός ή ωοειδής δίσκος, γνωστός ως «πυρίτιο», με δύο καρπόφυλλα, και όταν ωριμάσει, γίνεται ασημί και διαφανές, αποκαλύπτοντας τους επίπεδους σπόρους σε σχήμα δίσκου μέσα. Ανθίζει συνήθως από τον Μάρτιο έως τον Απρίλιο και βρίσκεται συνήθως σε κήπους, λιβάδια και κατά μήκος των δρόμων. Το φυτό χρησιμοποιείται επίσης σε συνθέσεις λουλουδιών για τους χαρακτηριστικούς λοβούς σπόρων του, οι οποίοι συχνά αναφέρονται ως "ασημένια δολάρια" (Guidetti, G., et al., 2020).

Είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φυτό που μπορεί να βρεθεί σε ανθρωπογενείς περιοχές, ακαλλιέργητα χωράφια και σε παρυφές δρόμων έως και 900 μέτρα. Το όνομα του γένους "*Lunaria*" προέρχεται από τη λατινική λέξη "*Luna*", που σημαίνει φεγγάρι, καθώς οι ασημί, στρογγυλοί λοβοί σπόρων του φυτού μοιάζουν με το φεγγάρι. Η *Lunaria annua* είναι σημαντικό φυτό για τα μελισσοκομεία καθώς προσφέρει νέктar και γύρη για τις μέλισσες (Guidetti, G., et al., 2020).

Η *Lunaria annua* σπάνια προσβάλλεται από το ωίδιο, το οποίο είναι μια μυκητιακή ασθένεια που μπορεί να επηρεάσει τα φύλλα, τα άνθη και τους βλαστούς των φυτών. Ωστόσο, μπορεί να προσβληθεί από ορισμένα είδη αφίδων την άνοιξη. Παρά αυτές τις προκλήσεις, παραμένει ένα δημοφιλές καλλωπιστικό φυτό λόγω των ελκυστικών ανθέων, των μοναδικών λοβών σπόρων και της ανθεκτικότητάς του σε ποικίλες συνθήκες καλλιέργειας.



Εικόνα 23. Σπόροι *Lunaria annua*

Πηγή εικόνας : (carymagazine.com)

Οι σπόροι της *Lunaria annua* περιέχουν υψηλή ποσότητα ελαίου, συνήθως μεταξύ 30-35%. Το έλαιο αυτό αποτελείται από 67% λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, με το 44% να είναι ερουκικό οξύ (C22:1) και το 23% να είναι νευρονικό οξύ (C24:1). Η μοναδική σύνθεση αυτών των λιπαρών οξέων καθιστά το έλαιο *Lunaria annua* κατάλληλο ως λιπαντικό, ιδιαίτερα σε εφαρμογές όπου απαιτείται υψηλό ιξώδες και σταθερότητα (Guidetti, G., et al., 2021).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι το νευρονικό οξύ, που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο έλαιο της *Lunaria*, μπορεί να έχει θεραπευτικές ιδιότητες και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ενός φαρμάκου κατά της πολλαπλής σκλήρυνσης. Ωστόσο, η διετής φύση του φυτού αποτελεί σημαντική πρόκληση για οικονομικά εφικτή παραγωγή λαδιού *Lunaria*, καθώς απαιτεί αναφύτευση κάθε δύο χρόνια (Guidetti, G., et al., 2021).

- **Ανθοκυανίνες και ενώσεις που περιέχονται στην *Lunaria annua* :**

Κυανιδίνη 3-O-[ξυλοσυλο-(1→2)-(6''-E-π-κουμαροϋλογλυκοζίτης)]-5-O-(6''-μαλονυλογλυκοζίτης), 3-O-[ξυλοσυλο-(1→2)-(6''-Z-π-κουμαροϋλογλυκοζίτης)]-κυανιδίνη 5-O-(6''-μαλονυλογλυκοζίτης), κυανιδίνη 3-O-[ξυλοσυλο-(1→2)-(6''-E-φερουλοϋλογλυκοζίτης)]-5-O-(6''-μηλονυλογλυκοζίτης), γλυκοσινολικά, φλαβονοειδή, σαπωνίνες και τριτερπένια (Katanić Stanković, Jelena S., et al., 2022).

2.2 *Campanula versicolor*

Βασίλειο: Plantae

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα

Τάξη: Campanulales

Οικογένεια: Campanulaceae

Γένος: Campanula

Είδος: versicolor

Κοινή Ονομασία: Καμπανούλα ποικιλόχρους



Εικόνα 24 : *Campanula versicolor*

(Πηγή εικόνας: jungledragon.com)

Η *Campanula* προέρχεται από τη λατινική λέξη "campana", που σημαίνει κουδούνι. Αυτό το όνομα δόθηκε στο φυτό λόγω της εμφάνισης σε σχήμα καμπάνας των λουλουδιών του. Το δεύτερο μέρος του ονόματος, "versicolor", αναφέρεται στο γεγονός ότι τα λουλούδια αλλάζουν χρώμα κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του φυτού. Όταν τα πέταλα ανοίγουν για πρώτη φορά, έχουν ένα βαθύ μπλε-ιώδες χρώμα, το οποίο στη συνέχεια ξεθωριάζει σε μια πιο ανοιχτή απόχρωση καθώς το λουλούδι γερνάει (Ράγγα Ζ, 2014).

Η *Campanula versicolor*, πήρε το όνομά της από το γεγονός ότι τα άνθη της αλλάζουν χρώμα κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής της. Είναι επίσης γνωστό ως "καμπάνα των βράχων" επειδή συνήθως αναπτύσσεται σε βραχώδες έδαφος ή ανάμεσα σε φυτά κολιτσίδας και γαλατσίδες του γένους *Euphorbia*, τα οποία ονομάζονται έτσι για τον γαλακτώδη χυμό που απελευθερώνεται όταν κόβεται το στέλεχος.

Αυτό το φυτό είναι ένα πολυετές, ποώδες είδος που είναι αυτοφυές στην Ελλάδα. Αναπτύσσεται σε ύψος 0,5-1,2 μέτρα και έχει ισχυρό ριζικό σύστημα που του επιτρέπει να ευδοκιμεί σε ασβεστολιθικά εδάφη και σε βραχώδεις εξάρσεις. Λόγω της προσαρμοστικότητάς του, είναι μια δημοφιλής επιλογή για κηπουρούς και λάτρεις του τοπίου που θέλουν να προσθέσουν χρώμα και υφή σε βραχώκηπους ή άλλες περιοχές με καλή αποστράγγιση (Ράγγα Ζ, 2014).

Το στέλεχος της *Campanula versicolor* είναι όρθιο και τα φύλλα είναι λεία, λογχοειδή ή σε σχήμα καρδιάς, με οδοντωτό περιθώριο. Ωστόσο, τα άνθη είναι το πιο χαρακτηριστικό και οπτικά εντυπωσιακό μέρος του φυτού, και το είδος αυτό οφείλει μεγάλο μέρος της διακοσμητικής του αξίας σε αυτά. Τα άνθη είναι διατεταγμένα και ερμαφρόδιτα, που σημαίνει ότι έχουν και ύπερο και στήμονες. Έχουν πέντε σέπαλα και μια στεφάνη που σχηματίζεται από πέντε πέταλα που δίνουν στο λουλούδι το χαρακτηριστικό του σχήμα καμπάνας. Το χρώμα των πετάλων κυμαίνεται από ένα βαθύ μπλε-ιώδες έως μια πιο ανοιχτή απόχρωση του μπλε-ιώδους καθώς το λουλούδι ωριμάζει (Ράγγα Ζ, 2014).



Εικόνα 25. Σπόροι *Campanula versicolor*

(Πηγή εικόνας : farmhouseandblooms.com)

Το ζωντανό μπλε-ιώδες χρώμα των ανθέων της *Campanula versicolor* καθορίζεται από τους συγκεκριμένους τύπους και τις ποσότητες χρωστικών που υπάρχουν. Όπως συμβαίνει με πολλά άλλα άνθη και καρποί, αυτές οι χρωστικές είναι συχνά φλαβονοειδή, τα οποία περιλαμβάνουν ανθοκυανίνες, φλαβόνες και φλαβονόλες. Αυτές οι χρωστικές είναι υδατοδιαλυτές και βρίσκονται στους χρωμοπλάστες των φυτικών ιστών. Αντίθετα, το λευκό χρώμα των πετάλων σε πολλά άνθη είναι αποτέλεσμα της παρουσίας ανθοξανθινών, οι οποίες είναι επίσης ένα είδος φλαβονοειδούς χρωστικής. Μεταβάλλοντας τους τύπους και τις αναλογίες αυτών των χρωστικών, τα φυτά μπορούν να δημιουργήσουν μια ποικιλία χρωμάτων και αποχρώσεων, καθιστώντας τα οπτικά ελκυστικά τόσο στους επικονιαστές όσο και στους ανθρώπους (Ράγγα Ζ, 2014).

Το άρωμα της *Campanula versicolor* είναι μια μοναδική και σαγηνευτική πτυχή του φυτού, καθώς θυμίζει γαρύφαλλο και μπορεί να ανιχνευθεί μόνο τις ζεστές μέρες. Πιστεύεται ότι εξειδικευμένες δομές μέσα στα λουλούδια παράγουν το άρωμα, αλλά οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες που είναι υπεύθυνες δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί. (Ράγγα Ζ, 2014).

Η *Campanula versicolor* είναι ευαίσθητη σε ορισμένες ιολογικές ασθένειες που επηρεάζουν τα φυτά του γένους *Campanula*. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο ιός που οφείλεται στον κηλιδωτό μαρασμό της τομάτας (TSWV) ο οποίος εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Αυστραλία και προκαλεί χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες καθώς και μαρασμό των φύλλων. Αυτός ο ιός μπορεί να επηρεάσει τόσο αυτοφυή φυτά όσο και καλλιεργούμενα. Ένας άλλος ιός που μπορεί να επηρεάσει την *Campanula versicolor* είναι ο ιός της νεκρωτικής κηλίδωσης ειδών του γένους *Impatiens* (INSV), ο οποίος προκαλεί νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, που οδηγούν σε κατσαρώματα, μαρασμό και κιτρίνισμα. Αυτός ο ιός μπορεί επίσης να προκαλέσει νανισμό και νέκρωση της αναπτυσσόμενης άκρης των φύλλων. Εκτός από ιογενείς ασθένειες, η *Campanula versicolor* μπορεί επίσης να προσβληθεί από φυτοφάγα ακάρεα και αφίδες (Ράγγα Ζ, 2014).

Επιπλέον, έχει αξιοσημείωτη θρεπτική αξία, καθώς τα φύλλα του είναι καλή πηγή βιταμίνης C και έχουν μια ήπια, ελαφρώς γλυκιά γεύση που μπορεί να θυμίζει αρακά. Τα άνθη του φυτού, όταν καταναλώνονται ωμά, χρησιμοποιούνται για να προσθέσουν διακόσμηση σε σαλάτες και είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες στο σώμα. Αυτά τα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν βιταμίνη A, C και E, φλαβονοειδή, σελήνιο, β -καροτένιο, ψευδάργυρο και αρκετούς τύπους λυκοπενίου. Αυτές οι ουσίες βοηθούν στην προστασία των κυττάρων του σώματος από το οξειδωτικό στρες και μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο ορισμένων χρόνιων ασθενειών (Ράγγα Ζ, 2014)

- **Ενώσεις και ανθοκυανιδίνες που υπάρχουν στην *Campanula versicolor* :**

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων της *C. versicolor* (συλλογή από Βέλες, Β. Μακεδονίας) είναι: λουτεονυλο-7-O-ετερογλυκοζίτης, λουτεονυλο-7-O-ρουτινοζίτης,

λουτεονυλο-7-O-γλυκοζίτης, φλαβονοειδές 1 (παράγωγο λουτεονίνης), φλαβονοειδές 2 (7-O-ετερογλυκοζίτης της λουτεονίνης ή παράγωγό της) και απιγενινο-7-O-γλυκοζίτης (Janković, I.B., Drobac, M.M., & Lakušić, D.V., 2014).

ΜΕΡΟΣ 3

3.1 Be2C

Για δεκαετίες, οι κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιολογία του καρκίνου ως πρότυπο για τη διερεύνηση μοριακών μηχανισμών και τον έλεγχο των επιπτώσεων των γενετικών και χημικών διαταραχών. Τα πειράματα που πραγματοποιούνται σε κυτταρικές σειρές συχνά θέτουν τα θεμέλια για περαιτέρω διερεύνηση της βιολογικής απόκρισης σε ζωικά μοντέλα, παρέχοντας τελικά πολύτιμες μεταφραστικές εισροές για την κλινική ιατρική. Μετά την έλευση της εποχής των omics, οι επιστήμονες απέκτησαν την ικανότητα να αντιστοιχίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με τα χαρακτηριστικά γονιδιωματικής, επιγονιδιωματικής και μεταγραφωμικής συγκεκριμένων υποτύπων όγκων. Τα τελευταία χρόνια, οι εξελίξεις στη διάγνωση στον προσδιορισμό γονιδιωματικής αλληλουχίας επέτρεψαν στους ερευνητές να επιλέξουν, σχεδόν σε πραγματικό χρόνο, το κορυφαίο αντίστοιχο μοντέλο κυτταρικής σειράς για μεμονωμένους καρκινοπαθείς ως βασικό βήμα των προσεγγίσεων της ιατρικής ακριβείας (Mercatelli, Daniele, et al., 2021).

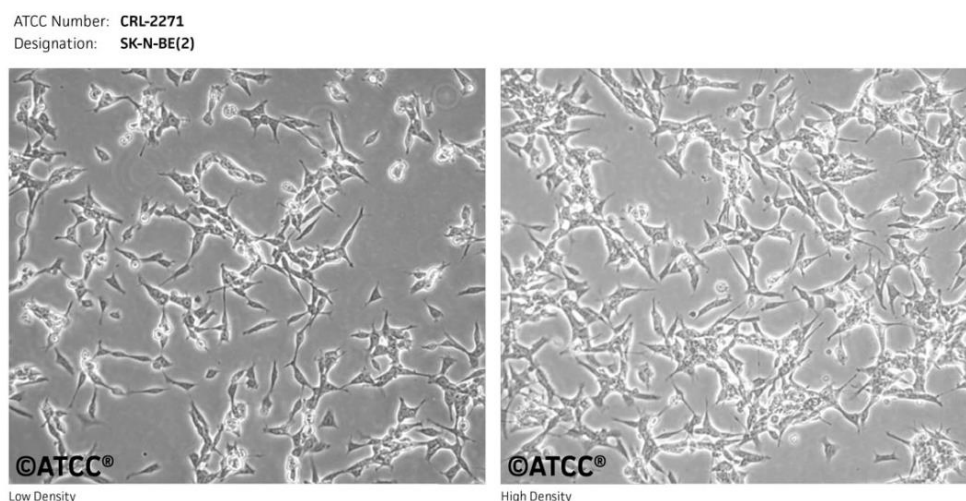
Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των πειραμάτων με βάση τις κυτταρικές σειρές είναι η υψηλή αναπαραγωγιμότητά τους με βάση το γεγονός ότι οι κυτταρικές σειρές είναι γενετικά σταθερές και μεταγραφικά πιο ομοιογενείς από τα *in vivo* μοντέλα όγκων.

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι οι κυτταρικές σειρές από διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να παρουσιάζουν γενετικές και μεταγραφικές αλλοιώσεις, λόγω κλωνικών και εξελικτικών αποκλίσεων, οι οποίες μπορεί να ευθύνονται για περιστασιακές διαφορές στους φαινότυπους και τις φαρμακολογικές αποκρίσεις. Ενώ η ποικιλομορφία των κυτταρικών σειρών μεταξύ εργαστηρίων έχει αναγνωριστεί κριτικά και ευρέως, η ετερογένεια εντός εργαστηρίου και εντός της πλάκας των καλλιιεργειών κυτταρικής σειράς συχνά αγνοείται, παρά τις ενδείξεις ότι υπάρχουν χωρικές προκαταλήψεις ακόμη και σε κυτταροκαλλιέργειες (Mercatelli, Daniele, et al., 2021).

Συγκεκριμένα, το SK-N-BE(2)-C είναι μια κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος που προέρχεται από ανθρώπινο μυελό των οστών. Τα κύτταρα είναι προσκολλημένοι νευροβλάστες. Όπως και η γονική κυτταρική σειρά, αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν ενίσχυση MYCN. Η θεραπεία με trans-ρετινοϊκό οξύ διαφοροποιεί αυτά τα κύτταρα σε έναν ξεχωριστό νευρωνικό φαινότυπο. Αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλά

επίπεδα δραστηριότητας υδροξυλάσης της τυροσίνης και δραστηριότητα β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης.

Η γονική κυτταρική σειρά καθιερώθηκε το 1972 από μια μεταστατική θέση (μυελός των οστών) σε ένα δίχρονο παιδί με κακοήθες νευροβλάστωμα.



Εικόνα 26. Κύτταρα Be2c σε καλλιέργεια

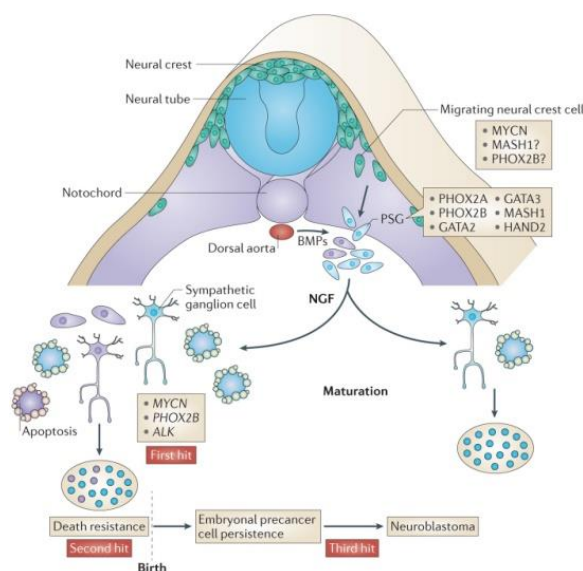
(Πηγή εικόνας : atcc.org)

3.1.1 Νευροβλάστωμα

Μεταξύ των όγκων, το νευροβλάστωμα (NBL) είναι ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ενός εξαιρετικά ιστολογικά ετερογενούς καρκίνου. Το NBL είναι ο πιο κοινός εξωκρανιακός συμπαγής όγκος της πρώιμης παιδικής ηλικίας που προέρχεται από κύτταρα νευρικής ακρολοφίας, παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα κλινικής συμπεριφοράς, που εκτείνεται από αυθόρμητη παλινδρόμηση χωρίς χημειοθεραπεία έως συχνή μεταστατική εκδήλωση με φαινότυπο ανθεκτικό στα φάρμακα, ειδικά σε ηλικιωμένους ασθενείς (Mercatelli, Daniele, et al., 2021). Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, τα κύτταρα εντός της νευρικής ακρολοφίας υποβάλλονται σε επιθηλιακή μετάβαση σε μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) επιτρέποντας στα κύτταρα να αποκολληθούν, να μεταναστεύσουν και να διαφοροποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών τύπων που συμβάλλουν στις ανατομικές δομές εντός του οργανισμού. Αυτή η διεργασία ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο σύνολο εξωτερικής σηματοδότησης, ενεργοποίηση μεταγραφικών προγραμμάτων και επιγενετικών γεγονότων. Η δυσλειτουργία των παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτή τη διεργασία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις προδιαγραφές των κυττάρων και στην απορρυθμισμένη μετανάστευση και -κυτταρική διαφοροποίηση, προκαλώντας υπερνεοπλασματικές αλλοιώσεις που τελικά μπορεί να οδηγήσουν σε

νευροβλάστωμα. Αυτά τα συμβάντα μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης της νευρικής ακρολοφίας και οι παράγοντες που πιστεύεται ότι είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη νευροβλαστώματος είναι εγκιβωτισμένοι με κόκκινο χρώμα.

Η απορρυθμισμένη έκφραση του MYCN είναι ο πιο ισχυρός ογκογόνος οδηγός για το νευροβλάστωμα και προκαλεί πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων της συμπαθοεπινεφριδιακής γενεαλογίας, ενώ η *LIN28B* ελέγχει την έκφραση του MYCN μέσω της ρύθμισης του Let-7 miRNA. Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (*ALK*) και το ζευγαρωμένο *homeobox 2B* (*PHOX2B*) είναι μεταλλάξεις βλαστικής σειράς που βρίσκονται στο νευροβλάστωμα. Η σηματοδότηση Rho είναι ζωτικής σημασίας για τη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων ακρολοφίας ελέγχοντας την αναστολή επαφής της μετακίνησης μεταξύ των νευρικών κυττάρων ακρολοφίας. Τα σύμπλοκα SWI/SNF είναι ογκοκατασταλτικά που συντονίζουν ποικίλες αλλοιώσεις χρωματίνης που επηρεάζουν τη μεταγραφική έξοδο, την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA (Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. 2019).



Εικόνα 27. Ανάπτυξη νευροβλαστώματος από νευρική ακρολοφία

(Πηγή εικόνας : Marshall, Glenn M., et al., 2014)

3.1.2 Συμπτώματα

Το νευροβλάστωμα μπορεί να ξεκινήσει σε διαφορετικά σημεία του σώματος. Τα κύτταρα νευροβλαστώματος μπορούν επίσης μερικές φορές να απελευθερώσουν χημικές ουσίες που ονομάζονται ορμόνες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν άλλα μέρη του σώματος. Μερικά από τα πιο κοινά συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Εξόγκωμα ή πρήξιμο στην κοιλιά του παιδιού που δεν φαίνεται να πονάει
- Πρήξιμο στα πόδια ή στο άνω μέρος του στήθους, του λαιμού και του προσώπου
- Προβλήματα με την αναπνοή ή την κατάποση
- Απώλεια βάρους
- Προβλήματα με τις κινήσεις του εντέρου ή την ούρηση
- Πόνος στα οστά
- Εξογκώματα ή εξογκώματα κάτω από το δέρμα, τα οποία μπορεί να φαίνονται μπλε
- Πτώση βλεφάρου και μικρή κόρη (η μαύρη περιοχή στο κέντρο του ματιού) στο ένα μάτι
- Προβλήματα που είναι σε θέση να αισθανθούν ή να κινήσουν μέρη του σώματος
- Μάτια που φαίνεται να διογκώνονται και/ή να μελανιάζουν γύρω από τα μάτια

Τα σημεία και τα συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το πού είναι ο όγκος, πόσο μεγάλος είναι, και αν ο όγκος παράγει ορμόνες.

3.1.3 Αιτιολογία

Τα ακριβή αίτια του νευροβλαστώματος δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά, αλλά η έρευνα δείχνει ότι μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

- **Γενετικοί παράγοντες:** Ορισμένες γενετικές μεταλλάξεις ή αλλαγές μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης νευροβλαστώματος. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να κληρονομηθούν από έναν γονέα ή μπορεί να συμβούν αυθόρμητα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Ορισμένα γενετικά σύνδρομα, όπως η νευροϊνωμάτωση τύπου I, μπορούν επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο νευροβλαστώματος.
- **Περιβαλλοντικοί παράγοντες:** Η έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί επίσης να αυξήσει τον κίνδυνο νευροβλαστώματος. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν την έκθεση της μητέρας σε ορισμένες χημικές ουσίες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, την έκθεση σε ακτινοβολία και ορισμένες λοιμώξεις. Ωστόσο, τα στοιχεία για αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες δεν είναι ακόμη οριστικά.

Άλλοι παράγοντες κινδύνου που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης νευροβλαστώματος περιλαμβάνουν την ηλικία (συνήθως εμφανίζεται σε παιδιά κάτω των 5 ετών), τη φυλή (είναι πιο συχνή στους Καυκάσιους) και το φύλο (τα αγόρια είναι ελαφρώς πιο πιθανό να το αναπτύξουν από τα κορίτσια).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι περισσότερες περιπτώσεις νευροβλαστώματος εμφανίζονται αυθόρμητα χωρίς αναγνωρίσιμους παράγοντες κινδύνου και ότι πολλά παιδιά με αυτούς τους παράγοντες κινδύνου δεν θα αναπτύξουν τη νόσο (Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. 2019).

3.1.4 Παθογένεση

Η παθογένεση του νευροβλαστώματος είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό ανώριμων νευρικών κυττάρων. Εδώ είναι μερικά από τα βασικά συμβάντα που εμπλέκονται στην παθογένεση του νευροβλαστώματος:

- **Ανώμαλη ενεργοποίηση ογκογονιδίων:** Μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, όπως το *MYCN*, το *ALK* και το *PHOX2B*, παρατηρούνται συχνά στο νευροβλάστωμα. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων
- **Απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων:** Μεταλλάξεις σε γονίδια που φυσιολογικά καταστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό, όπως το *TP53* και το *PTEN*, παρατηρούνται επίσης συχνά στο νευροβλάστωμα. Η απώλεια αυτών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και σχηματισμό όγκου
- **Χρωμοσωμικές ανωμαλίες:** Το νευροβλάστωμα χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων κερδών και απωλειών ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων χρωμοσωμάτων. Αυτές οι χρωμοσωμικές αλλαγές μπορούν να αλλάξουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του όγκου
- **Επιγενετικές τροποποιήσεις:** Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις ιστόνης, μπορούν επίσης να συμβάλουν στην ανάπτυξη νευροβλαστώματος αλλάζοντας τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης

- **Μικροπεριβαλλοντικοί παράγοντες:** Το μικροπεριβάλλον του όγκου, το οποίο περιλαμβάνει παράγοντες όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού, αιμοφόρα αγγεία και συστατικά εξωκυτταρικής μήτρας, μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στην παθογένεση του νευροβλαστώματος παρέχοντας υποστήριξη για την ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου

Συνολικά, η παθογένεση του νευροβλαστώματος είναι μια πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις, καθώς και μικροπεριβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των ανώριμων νευρικών κυττάρων (Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. 2019).

3.1.5 Αντιμετώπιση - Θεραπεία

Η θεραπεία του νευροβλαστώματος εξαρτάται από το στάδιο της νόσου, την ηλικία του ασθενούς και άλλους μεμονωμένους παράγοντες και συνήθως περιλαμβάνει έναν συνδυασμό διαφορετικών θεραπειών. Ορισμένες συνήθειες θεραπευτικές επιλογές για το νευροβλάστωμα είναι:

- **Χειρουργική επέμβαση:** Η χειρουργική επέμβαση χρησιμοποιείται συχνά για την αφαίρεση του όγκου, είτε εν μέρει είτε πλήρως, ανάλογα με το μέγεθος και τη θέση του όγκου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η χειρουργική επέμβαση μπορεί να ακολουθηθεί από ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία
- **Χημειοθεραπεία:** Η χημειοθεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση φαρμάκων για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται συχνά για τη συρρίκνωση του όγκου πριν από τη χειρουργική επέμβαση, για τη θεραπεία τυχόν καρκινικών κυττάρων που έχουν απομείνει μετά τη χειρουργική επέμβαση ή για τη θεραπεία του καρκίνου που έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος
- **Ακτινοθεραπεία:** Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί ακτινοβολία υψηλής ενέργειας για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται συχνά μετά από χειρουργική επέμβαση για να σκοτώσει τυχόν εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα ή ως κύρια θεραπεία για όγκους που δεν μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά

- **Ανοσοθεραπεία:** Η ανοσοθεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση φαρμάκων που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα να επιτεθεί στα καρκινικά κύτταρα. Η ανοσοθεραπεία είναι μια νεότερη θεραπευτική επιλογή για το νευροβλάστωμα και έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές
- **Στοχευμένη θεραπεία:** Η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα που στοχεύουν συγκεκριμένα μόρια ή μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η στοχευμένη θεραπεία είναι μια άλλη νεότερη θεραπευτική επιλογή για το νευροβλάστωμα που έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενη σε κλινικές δοκιμές
- **Μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων:** Η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου, ιδιαίτερα εάν η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία ήταν ανεπιτυχείς. Η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων περιλαμβάνει την αντικατάσταση του κατεστραμμένου μυελού των οστών με υγιή βλαστοκύτταρα που μπορούν να εξελιχθούν σε νέα κύτταρα αίματος (Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. 2019).

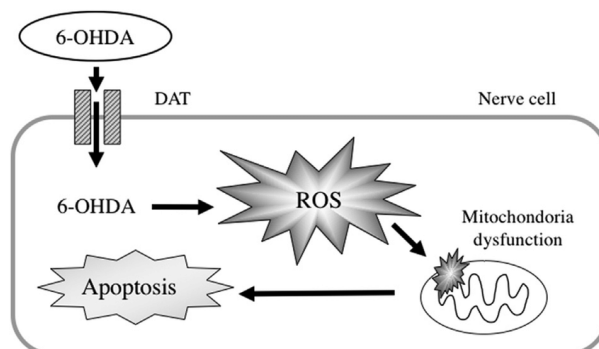
ΜΕΡΟΣ 4

4.1 6-Υδροξυδοπαμίνη (6-OHDA)

Η κατεχολαμινεργική νευροτοξίνη 6-υδροξυδοπαμίνη (6-OHDA) βρέθηκε πρόσφατα να σχηματίζεται ενδογενώς σε ασθενείς που πάσχουν από νόσο του Πάρκινσον. Η 6-OHDA έχει δύο τρόπους δράσης: σχηματίζει εύκολα ελεύθερες ρίζες και είναι ένας ισχυρός αναστολέας των συμπλόκων I και IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Η αναστολή των αναπνευστικών ενζύμων από την 6-OHDA είναι αναστρέψιμη και μη ευαίσθητη σε ελεύθερες ρίζες και τους χηλικούς παράγοντες σιδήρου με εξαίρεση τη δεσφερριτοξαμίνη.

Συμπεραίνουμε ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του 6-OHDA και της αναπνευστικής αλυσίδας και ότι οι δύο μηχανισμοί είναι βιοχημικά ανεξάρτητοι, αν και μπορεί να δρουν συνεργατικά *in vivo*. Επίσης, η 6-OHDA προάγει την ενεργοποίηση του ενζύμου COX-2, οδηγώντας σε σύνθεση και έκκριση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-1β και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για

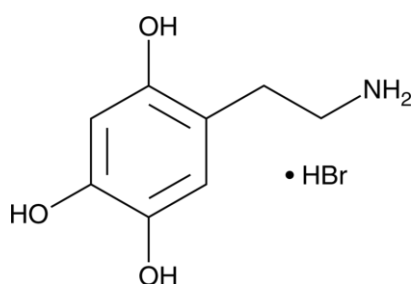
την διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ADHD), και το σύνδρομο Lesch-Nyhan (Kaji, Haruka, et al., 2020).



Εικόνα 28. Μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικού στρες από 6 - OHDA

(Πηγή εικόνας : Kaji, Haruka, et al., 2020)

Η τοξίνη 6-υδροξυνοτοπαμίνη συσσωρεύεται εντός των κυττάρων λόγω της δομικής της ομοιότητας με τις ενδογενείς κατεχολαμίνες, και αυτό συμβαίνει μέσω των μεμβρανικών μεταφορέων ντοπαμίνης ή νοραδρεναλίνης. Η τοξίνη αυτή δρα καταστρέφοντας τα κύτταρα με οξειδωτικό στρες, προκαλώντας αυτό-οξείδωση και παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου και κινονών που επιτίθενται στο εσωτερικό των κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε ανωμαλίες στη δομή και το μεταβολισμό των κυττάρων και, τελικά, σε βλάβη του νευρικού κυττάρου. Η αύξηση των επιπέδων των ουσιών αυτών οδηγεί στην ταχεία εξάντληση των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, επιδεινώνοντας τη βλάβη των νευρικών κυττάρων (Μαγούλα Μ., 2020).



Εικόνα 29. Χημική δομή 6 - OHDA

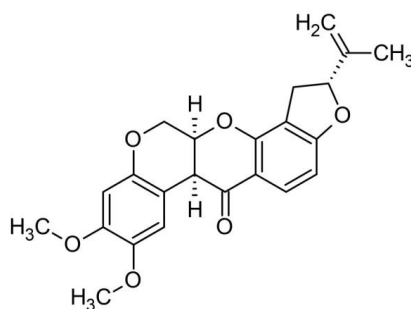
(Πηγή εικόνας : caymanchem.com)

Η νόσος του Πάρκινσον (PD) είναι μια σημαντική νευροεκφυλιστική ασθένεια στους ηλικιωμένους που επηρεάζει 10 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως. Η νόσος του

Πάρκινσον χαρακτηρίζεται από μαζική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία *pars compacta* (SNc), οδηγώντας σε κλινικά συμπτώματα όπως βραδυκινησία και ακαμψία (σύμφωνα με το Ίδρυμα νόσου του Πάρκινσον). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η νόσος του Πάρκινσον εμφανίζεται όταν ήδη το 50% αυτών των νευρώνων καταστρέφονται (Perlberg, Vincent, et al., 2018).

4.2 Ροτενόνη (Rotenone)

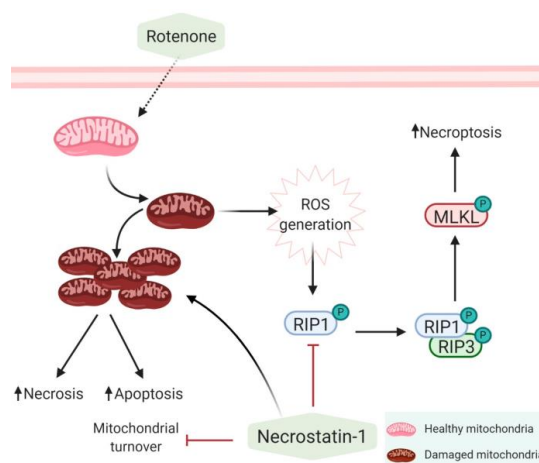
Η ροτενόνη είναι μια φυσική ένωση, άοσμη, άχρωμη, κρυσταλλική ισοφλαβόνη που χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο και ζιζανιοκτόνο. Είναι μια φυσική σύνθετη κετόνη, που προέρχεται από τις ρίζες των ειδών του γένους *Lonchocarpus* και είναι μια εξαιρετικά λιπόφιλη ένωση. Είναι ελαφρώς τοξική για τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, αλλά εξαιρετικά τοξική για τα έντομα και την υδρόβια ζωή, όπως τα ψάρια.



Εικόνα 30. Χημική δομή Ροτενόνης

(Πηγή εικόνας : abcam.com)

Η ροτενόνη ως δραστική ουσία χρησιμοποιείται σε πολλά εντομοκτόνα στις ΗΠΑ και σε όλο τον κόσμο. Επιδημιολογικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε ροτενόνη μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον (PD). Πολυάριθμες πειραματικές μελέτες οδήγησαν σε τέτοιες επιδημιολογικές μελέτες που έδειξαν ότι η ροτενόνη παράγει φαινότυπο PD σε ζωικά μοντέλα. Διάφορα πειραματόζωα που εκτίθενται σε ροτενόνη παρουσιάζουν απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων και σχηματισμό ειδικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων σύμφωνα με τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της PD. Σε υποκυτταρικό επίπεδο η αναστολή του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός νευροτοξικής δράσης. Ορισμένες μελέτες έχουν επισημάνει άλλους μηχανισμούς όπως η διαταραχή της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων κατά τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Η συστηματική έκθεση επίμυων σε ροτενόνη με δόσεις που επηρεάζουν την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μοντέλο PD (Lawana, V., & Cannon, J. R., 2020).



Εικόνα 31. Μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που επάγονται από την Ροτενόνη

(Πηγή εικόνας: Alegre-Cortés, Eva, et al., 2020)

ΜΕΡΟΣ 5

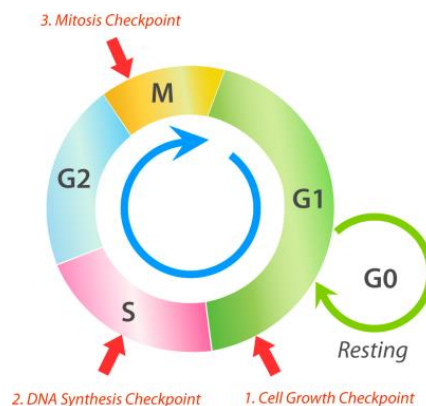
5.1. Ki67

Το αντιγόνο Ki67 ανιχνεύθηκε το 1983 ως πυρηνική πρωτεΐνη σε κυτταρική σειρά λεμφώματος Hodgkin. Αυτή η πρωτεΐνη εκφράζεται στη φάση G1, S, G2 και M του κυτταρικού κύκλου, αλλά όχι σε κύτταρα που βρίσκονται σε καταστολή (Φάση G0). Το Ki67 χρησιμοποιείται συχνά ως προγνωστικός και διαγνωστικός δείκτης στον καρκίνο, καθώς μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων όγκων και μπορεί επίσης να υποδεικνύει την επιθετικότητα ενός όγκου. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης Ki67 στα καρκινικά κύτταρα συχνά υποδεικνύουν υψηλό ποσοστό πολλαπλασιασμού και έναν πιο επιθετικό όγκο. Η ανίχνευση της έκφρασης Ki67 σε καρκινικά κύτταρα πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοϊστοχημείας (IHC). Το IHC περιλαμβάνει τη χρήση αντισωμάτων για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε δείγματα ιστών και χρησιμοποιείται συχνά στη διάγνωση και τον σχεδιασμό θεραπειών του καρκίνου (Denkert, Carsten, et al., 2015).

Ο κυτταρικός κύκλος είναι ένα σύνολο γεγονότων που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο κατά τη διάρκεια της ζωής του. Αποτελείται από διάφορες φάσεις, με κάθε φάση να έχει συγκεκριμένα γεγονότα και δραστηριότητες. Οι κύριες φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι οι εξής:

- **Φάση G1 :** Κατά τη φάση αυτή, το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος, προετοιμάζεται για την αντιγραφή του DNA και ελέγχεται για πιθανά σφάλματα πριν προχωρήσει στην επόμενη φάση
- **Φάση S :** Σε αυτή τη φάση, ο γενετικός κώδικας (DNA) του κυττάρου αντιγράφεται. Κατά τη διάρκεια της φάσης S, η ποσότητα του DNA στο κύτταρο διπλασιάζεται
- **Φάση G2 :** Κατά τη φάση αυτή, το κύτταρο εξακολουθεί να αυξάνεται και πραγματοποιούνται έλεγχοι ποιότητας για να εξασφαλιστεί ότι το DNA αντιγράφεται σωστά
- **Φάση M (Φάση Μίτωσης) :** Κατά τη φάση M, το κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Το DNA αρχικά συμπυκνώνεται για να σχηματίσει χρωμοσώματα τα οποία απομακρύνονται από μια μιτωτική άτρακτο. Αυτή η φάση M χωρίζεται περαιτέρω σε 4 στάδια , πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση
- **Φάση G0 :** Τα κύτταρα βρίσκονται σε καταστολή. (Σε κατάσταση ως μη αναπτυσσόμενα, μη διαιρούμενα)

Ο κυτταρικός κύκλος εξασφαλίζει τη σωστή ανάπτυξη, αναπαραγωγή και λειτουργία των κυττάρων σε έναν οργανισμό.



Εικόνα 32. Κυτταρικός κύκλος και τα 4 σημεία έλεγχου

(Πηγή εικόνας : people.duke.edu)

5.2. Ακετυλιωμένη τουμπουλίνη (Ac - tubulin)

Η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη αναφέρεται σε μια μορφή πρωτεΐνης τουμπουλίνης (σωληνίνης) που έχει τροποποιηθεί με την προσθήκη μιας ομάδας ακετυλίου σε ένα ή περισσότερα υπολείμματα λυσίνης στη δομή της. Η τουμπουλίνη είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί κύριο συστατικό των μικροσωληνίσκων, οι οποίοι είναι δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού και εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαίρεσης, της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και της κινητικότητας των κυττάρων. Η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για σταθερούς μικροσωληνίσκους, καθώς συνήθως βρίσκεται σε μικροσωληνίσκους μεγάλης διάρκειας ζωής που είναι λιγότερο δυναμικοί και πιο ανθεκτικοί στον αποπολυμερισμό. Επιπλέον, η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της νευρωνικής ανάπτυξης, του σχηματισμού βλεφαρίδων και μαστιγίων και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς.

Η ανίχνευση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης στα κύτταρα πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοφθορισμού ή ανοσοϊστοχημείας. Αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επισήμανση της πρωτεΐνης σε σταθερά κύτταρα ή ιστούς και τα προκύπτοντα μοτίβα φθορισμού ή χρώσης μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη θέση και τη λειτουργία των τροποποιημένων μικροσωληνίσκων (Nekooki-Machida, Y., & Hagiwara, H., 2020).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά διαφορετικών τμημάτων των φυτών *Campanula versicolor* και *Lunaria annua*. Ωστόσο, τα άνθη των φυτών αυτών δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς για τα πιθανά οφέλη τους στην ανθρώπινη υγεία. Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η σύγκριση των επιδράσεων που έχουν τα φυτικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* σε καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από το νευρικό σύστημα. Για να διερευνηθεί ο πιθανός προστατευτικός ρόλος αυτών των εκχυλισμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες υπό στρες, οι κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε 6-υδροξυντοπαμίνη και Ροτενόνη ως νευροτοξίνες. Αυτός ο πρόσθετος παράγοντας άγχους εισήχθη για να βοηθήσει στην κατανόηση των πιθανών επιπτώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 Εκχύλιση πετάλων

Πραγματοποιήθηκε η συλλογή των πετάλων από τα φυτά που θα χρησιμοποιηθούν στο πειραματικό μέρος.

Τοποθεσίες:

- *Lunaria annua*: Εθνική οδός Ιωαννίνων- Άρτας, Απρίλιος 2022
- *Campanula versicolor*: Λιθαρίτσια – Δικαστικό , Οκτώβριος 2023

Ακολούθησε ζύγισμα πετάλων όπου το βάρος τους κυμαινόταν στα 3g για κάθε φυτό. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα ζυγισμένα πέταλα σε γουδί και πραγματοποιήθηκε λειοτρίβιση με αποσταγμένο νερό. Το ποσοστό που αναλογεί είναι 10 mL διαλύματος ανά 1g πετάλων.

Τα εκχυλίσματα κατά τη διάρκεια της λειοτρίβισής τους διήλθαν από διηθητικό χαρτί (που τοποθετείται μέσα σε ένα χωνί) για να γίνει κατακράτηση των υπολειμμάτων από την εκχύλιση των πετάλων. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντριση στα 300Xg για 1' και τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε σωλήνες Falcon 15 mL. Την επόμενη μέρα τα εκχυλίσματα διήλθαν από φίλτρο με μέγεθος πόρων των 0,22 μm κάτω από στείρες συνθήκες για περεταίρω απομάκρυνση μικροβιακού φορτίου και αποθηκεύτηκαν στους - 80°C ώστε να διατηρηθούν για περαιτέρω πειράματα.

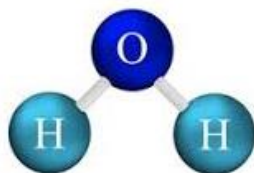
Τα εκχυλίσματα κατά τη διάρκεια της λειοτρίβισής τους διήλθαν από διηθητικό χαρτί (που τοποθετείται μέσα σε ένα χωνί) για να γίνει κατακράτηση των υπολειμμάτων από την εκχύλιση των πετάλων. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντριση στα 300G για 1' και τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν σε σωλήνες Falcon 15 mL. Την επόμενη μέρα τα εκχυλίσματα διήλθαν από φίλτρο με μέγεθος πόρων των 0,22 μm κάτω από στείρες συνθήκες για περεταίρω απομάκρυνση μικροβιακού φορτίου και αποθηκεύτηκαν στους - 80°C ώστε να διατηρηθούν για περαιτέρω πειράματα.

3.1.2 Διαλύτες εκχύλισης

Νερό (H₂O)

Ο προτιμώμενος διαλύτης που προαναφέραμε είναι το νερό. Το νερό είναι ένας πολικός διαλύτης που είναι ικανός να διαλύει ένα ευρύ φάσμα πολικών και ιοντικών

ενώσεων λόγω της υψηλής πολικότητας και της ικανότητάς του να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου. Πολλές πολικές ενώσεις, όπως σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, , γλυκοζίτες, αμινοξέα, πρωτεΐνες και ένζυμα, είναι πιο διαλυτές στο νερό παρά σε λιγότερο πολικούς διαλύτες. Το νερό χρησιμοποιείται συνήθως ως διαλύτης για την εκχύλιση ενεργών ενώσεων από φυτικά υλικά σε παραδοσιακά φυτικά φάρμακα, με αποτέλεσμα υδατικά εκχυλίσματα. Το pH του νερού είναι επίσης σημαντικό για την εκχύλιση ορισμένων ενώσεων, όπως τα αλκαλοειδή και τα φαινολικά οξέα. Τα αλκαλοειδή εκχυλίζονται συχνά χρησιμοποιώντας όξινες συνθήκες pH, ενώ τα φαινολικά εκχυλίζονται υπό βασικές συνθήκες. Το pH μπορεί να επηρεάσει την διαλυτότητα και την σταθερότητα αυτών των ενώσεων και η προσαρμογή του pH μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Milena, Vujanović, et al., 2019).



Εικόνα 33. Δομή νερού

(Πηγή εικόνας : freevector.com)

3.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων

Ο χειρισμός όλων των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (Telstar, BioIIAdvance) σε ειδικό δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε κλίβανο κυττάρων(FORMASCIENTIFIC), με σταθερή θερμοκρασία 37°C και 5% περιεκτικότητα CO₂. Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα Be2C αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τα ακόλουθα:

- DMEM-F12
- 10% FBS
- 1% A/A (Antibiotic/Antimycotic)

*(Πριν τη χρήση του ορού (FBS) πρέπει να θερμανθεί στους 56°C για 30 λεπτά, με σκοπό την αποφυγή τυχόν ανοσολογικών αποκρίσεων από τα κύτταρα λόγω των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού).

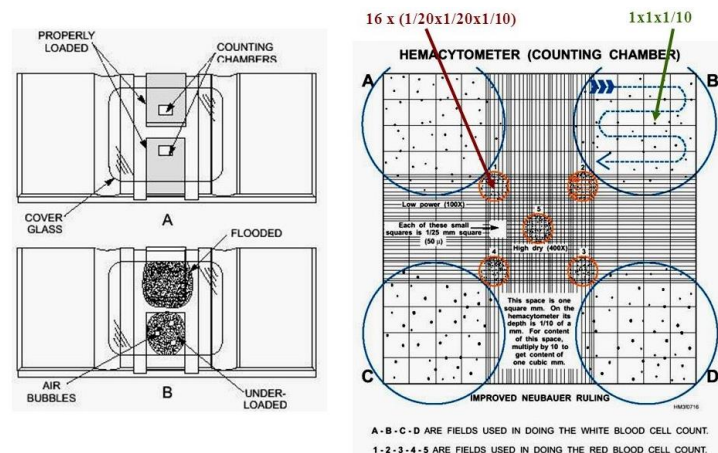
3.1.4 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων με την χρήση Θρυψίνης (Κυτταρικό Split)

Η διατήρηση της καλλιέργειας των κυττάρων, προϋποθέτει ότι όταν το ποσοστό των κυττάρων έχει καλύψει το 70-80% της συνολικής επιφάνειας του πιάτου, θα πρέπει πραγματοποιηθεί ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε καινούριο πιάτο με τη χρήση θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μία πρωτεάση η οποία καταστρέφει τις πρωτεΐνες προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια του πιάτου. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας για πιάτο διαμέτρου 100 mm περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το πιάτο καλλιέργειας
- Έκπλυση για απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού με 5 mL διαλύματος PBS 1x
- Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800 μ L θρυψίνης
- Επώαση στους 37°C για 4 λεπτά, με ελαφρά χτυπήματα κατά διαστήματα ώστε να διευκολυνθεί η αποκόλληση των κυττάρων
- Προσθήκη 4,2 mL νέου θρεπτικού για αδρανοποίηση της θρυψίνης και επαναιώρηση με χρήση πιπέτας μιας χρήσεως ώστε τα κύτταρα να γίνουν κατά βάση μονήρη
- Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο πιάτο, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό υλικό
- Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στο διάστημα των επόμενων 4-5 ωρών τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του πιάτου

3.1.5 Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer

Η χρήση της πλάκας Neubauer αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού προσεγγιστικά του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Η πλάκα αποτελείται από τέσσερα μεγάλα τετράγωνα που βρίσκονται στις γωνίες της πλάκας και υποδιαιρούνται σε άλλα μικρότερα. Αφού προστεθούν περίπου 10 μ L του κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα, καλύπτεται με καλυπτρίδα και ακολουθεί παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε καθένα από τα τέσσερα τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται επί 10^4 και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.



Εικόνα 34. Πλάκα Neubauer

(Πηγή εικόνας : slideplayer.gr)

3.1.6 Απόψυξη κυττάρων

Αρχικά, γίνεται προσθήκη 10 mL θρεπτικού μέσου σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας (100mm) και 8,2 mL σε Falcon των 50 mL. Στη συνέχεια, το κρυοφιαλίδιο με τα κύτταρα μεταφέρεται από το υγρό άζωτο στον επωαστικό θάλαμο (37°C), αφού καθαριστεί με αιθανόλη 70%, ανοίγοντας ελαφρώς το καπάκι για να εκτονωθεί η πίεση. Μόλις σχηματιστεί μια μπάλα πάγου στο κέντρο του φιαλιδίου, γίνεται μεταφορά του περιεχομένου στο falcon ώστε το ξεπάγωμα να ολοκληρωθεί σε αυτό το σημείο. Ακολουθούν, φυγοκέντρηση (900 rpm, 5 λεπτά), απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5 mL θρεπτικού, τα οποία λαμβάνονται από το πιάτο. Τέλος γίνεται μεταφορά κυττάρων στο πιάτο και επώαση στους 37°C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

3.1.7 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές μπορούν να διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ειδικά κρυοφιαλίδια τοποθετημένα σε υγρό άζωτο (-196°C). Για κάθε κρυοφιαλίδιο (χωρητικότητας 2 mL) απαιτούνται 900 μL κυτταρικού εναιωρήματος και 900 μL διαλύματος παγώματος (νευροβλάστωμα: 50% FBS, 20% DMSO, 30% DMEM, ενώ για τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα: 80% θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, 20% DMSO). Αρχικά πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων και φυγοκέντρηση τους (900 rpm, 5 λεπτά). Ακολουθεί απόμάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 900 μL θρεπτικού μέσου. Το εναιώρημα μεταφέρεται στο κρυοφιαλίδιο μαζί με 900 μL διαλύματος παγώματος και στη συνέχεια το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα ισοπροπανόλης για αργό πάγωμα στους -80°C.

Μετά από 16-24 ώρες μπορεί να γίνει αποθήκευση του κρυοφιαλιδίου στο υγρό άζωτο.

3.1.8 Καλλιέργεια των κυττάρων σε μικροφρεάτια με προσθήκη των εκχυλισμάτων

Η έναρξη της καλλιέργειας (Day 0), έγινε με την επίστρωση των κυττάρων σε μικροφρεάτια (6 φρεάτια) μέσα σε DMEM με 10% FBS σε συνολικό όγκο καλλιέργειας 2 mL και σε μικροφρεάτια (24 φρεάτια) σε συνολικό όγκο 0,5 mL . Μετά από 24 ώρες (Day 1) πραγματοποιήθηκε προσθήκη των εκχυλισμάτων στις κυτταρικές σειρές. Στις 24 ώρες (Day 2) από την προσθήκη των εκχυλισμάτων έγινε παρατήρηση των κυττάρων και στις 48 ώρες (Day 3), έγινε η μέτρηση και η 2η παρατήρηση των κυττάρων.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο
- Πλύση με PBS για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού μέσου (ο εμβρυϊκός ορός απενεργοποιεί τη θρυψίνη) και ανάδευση των κυττάρων υπό πίεση με σιφόνιο μιας χρήσεως προκειμένου να γίνουν μονήρη
- Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer

3.1.9 Παρασκευή της 6-υδροξυντοπαμίνης

Η προετοιμασία της τοξίνης 6-υδροξυντοπαμίνης για να εισαχθεί στην καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών και ακολουθεί τα ίδια ασηπτικά πρωτόκολλα.

- Προσθήκη 2 mL από διάλυμα 0.01% ασκορβικού οξέως στα 5 mg της τοξίνης 6-υδροξυντοπαμίνης. Έτσι προκύπτει ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM τοξίνης
- Το δείγμα χωρίζεται σε 40 μικρότερα δείγματα (φιαλίδια καλυμμένα με αλουμινόχαρτο), 50 μ L/φιαλίδιο και φυλάσσεται στους -20°C. Οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται στο σκοτάδι καθώς η τοξίνη είναι φωτοευαίσθητη

3.1.10 Παρασκευή της Ροτενόνης

Το προϊόν αυτό είναι διαλυτό σε χλωροφόρμιο (50 mg/mL), αποδίδοντας ένα διαυγές κίτρινο διάλυμα. Είναι επίσης διαλυτό σε DMSO (0,5 mg/mL). Τα διαλύματα σε οργανικούς διαλύτες αποσυντίθενται και οξειδώνονται κατά την έκθεση στο φως και

τον αέρα με τη δημιουργία χρώματος. Συγκέντρωση αποθέματος εργασίας: 2,5 mM (από το stock) = 2.500 μ M. Στην κυτταρική καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε 1,2 μ L/φρεάτιο από διάλυμα Ροτενόνης και 3.000 μ l DMEM.

3.1.11 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD

Η δοκιμασία πρωτεΐνης Bradford είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από 465nm σε 595nm. Για να πραγματοποιηθεί η δοκιμασία Bradford, κατασκευάζεται πρώτα μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις ενός προτύπου πρωτεΐνης, όπως η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA). Παρασκευάζεται μια σειρά από αραιώσεις του προτύπου και μια μικρή ποσότητα από κάθε αραιώση προστίθεται σε ξεχωριστό φρεάτιο μιας μικροπλάκας. Μια σταθερή ποσότητα του αντιδραστηρίου Bradford προστίθεται σε κάθε φρεάτιο και η πλάκα επωάζεται για καθορισμένο χρονικό διάστημα για να επιτραπεί στη χρωστική να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες.

Η απορρόφηση κάθε φρεατίου στη συνέχεια μετράται στα 595 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Οι τιμές απορρόφησης σχεδιάζονται σε συνάρτηση με τις γνωστές συγκεντρώσεις του προτύπου για τη δημιουργία μιας τυπικής καμπύλης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο άγνωστο δείγμα μπορεί στη συνέχεια να προσδιοριστεί μετρώντας την απορρόφησή της στα 595 nm και παρεμβάλλοντας την τιμή της στην τυπική καμπύλη.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ανάλυση Bradford είναι ευαίσθητη στην παρουσία ορισμένων ουσιών, όπως απορρυπαντικών και αναγωγικών παραγόντων, που μπορεί να επηρεάσουν τη δέσμευση της χρωστικής με πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται μια πρότυπη πρωτεΐνη που να είναι συμβατή με τις συγκεκριμένες συνθήκες και συστατικά του δείγματος που ελέγχεται.

Επιπλέον, η ανάλυση Bradford είναι μια σχετική και όχι μια απόλυτη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης και τα αποτελέσματα μπορούν να επηρεαστούν από τον τύπο και την καθαρότητα του χρησιμοποιούμενου προτύπου πρωτεΐνης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Πραγματοποιείται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1 mg/mL) σε

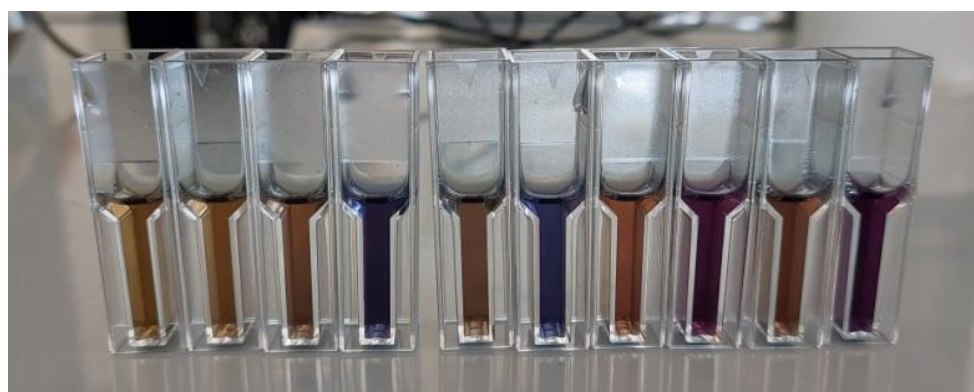
2,5 mL διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25μg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60sec και ακολουθεί φωτομέτρηση

2. Ποσότητα έως 40 μL δείγματος επαναιωρείται σε 2,5 mL αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60 sec και φωτομετρείται στα 595 nm

Τυφλό : Bradford	950μl Br + 50μl H ₂ O	0,516
Πρότυπο Λευκοματίνης Βόειου Ορού: BSA	950μl Br + 50μl BSA / 2μg	0,062
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Luna	0,2
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	950μl Br + 50μl Luna	0,7
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	940μl Br + 50μl BSA + 10 μl Luna	0,189
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	900μl Br + 50μl BSA + 50μl Luna	0,708
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Camp	0,194
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	950μl Br + 50μl Camp	0,784
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	940μl Br + 50μl BSA + 10 μl Camp	0,216
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	900μl Br + 50μl BSA + 50μl Camp	0,762

Τυφλό : H ₂ O	1ml	
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	H ₂ O 990μl + 10μl Camp	0,054
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	H ₂ O 990μl + 10μl Luna	0,094

Τυφλό : Bradford	1ml	0,06
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Camp / 1 min	0,12
<i>Campanula versicolor</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Camp / 5 min	0,194
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Luna / 1 min	0,139
<i>Lunaria annua</i> (H ₂ O)	990μl Br + 10μl Luna / 5 min	0,102



Εικόνα 35. Φωτομέτρηση εκχυλισμάτων από τα φυτά *Lunaria annua* και *Campanula versicolor*

3.1.12 Λυοφιλοποίηση

Η λυοφιλοποίηση, είναι μια διεργασία απομάκρυνσης του νερού από ένα υλικό με κατάψυξη και στη συνέχεια υποβολή του σε κενό, το οποίο αναγκάζει το κατεψυγμένο νερό να εξαχνωθεί απευθείας από τη στερεά κατάσταση στην αέρια κατάσταση χωρίς να περάσει από την υγρή φάση. Αυτή η διεργασία χρησιμοποιείται συνήθως για τη διατήρηση βιολογικών δειγμάτων, όπως πρωτεϊνών, κυττάρων και ιστών, καθώς και φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και άλλων ευαίσθητων υλικών, αφαιρώντας νερό από αυτά χωρίς να βλάψει τη δομή ή τη δραστηριότητά τους.

Η διεργασία λυοφιλοποίησης τυπικά περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια: κατάψυξη, αρχική ξήρανση και δευτερεύουσα ξήρανση. Στο στάδιο της κατάψυξης, το δείγμα καταψύχεται γρήγορα σε θερμοκρασία κάτω από το ευτηκτικό του σημείο, που είναι η θερμοκρασία στην οποία η στερεά και η υγρή φάση του υλικού έχουν την ίδια σύνθεση και ιδιότητες. Αυτό γίνεται για να αποτραπεί ο σχηματισμός μεγάλων κρυστάλλων πάγου που μπορούν να βλάψουν το δείγμα. Στο στάδιο της αρχικής ξήρανσης, το κατεψυγμένο δείγμα υποβάλλεται σε κενό, το οποίο προκαλεί την εξαχνωση του πάγου και την απομάκρυνση των υδρατμών. Στο δεύτερο στάδιο ξήρανσης, η υπολειπόμενη υγρασία αφαιρείται από το δείγμα αυξάνοντας τη θερμοκρασία και μειώνοντας το κενό.

Η διεργασία λυοφιλοποίησης χρησιμοποιείται συχνά στην έρευνα, ανάπτυξη και παραγωγή φαρμάκων, εμβολίων καθώς και στη διατήρηση βιολογικών δειγμάτων και υλικών για μακροχρόνια αποθήκευση ή μεταφορά. Ωστόσο, είναι μια πολύπλοκη και δαπανηρή διεργασία που απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και τεχνογνωσία και μπορεί να είναι δύσκολο να διατηρηθεί η ακεραιότητα και η δραστηριότητα του δείγματος κατά τη διάρκεια της διεργασίας.

3.1.13 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)

Η ανοσοαποτύπωση, γνωστή και ως Western blotting ή immunoblotting, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μεταφορά διαχωρισμένων πρωτεϊνών από μια πηκτή σε μια μεμβράνη, όπου διερευνάται η ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου με ειδικά αντισώματα.

Ακολουθούν τα βασικά βήματα για την εκτέλεση Western Blotting:

- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου
- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών

3.1.14 Ηλεκτροφόρηση των Δειγμάτων σε Πηκτή SDS – Πολυακρυλαμίδιο

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, αυτό γίνεται με τη χρήση πηκτών πολυακρυλαμιδίου. Οι πηκτές παρασκευάζονται με ανάμιξη ενός διαλύματος μονομερών ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου με έναν παράγοντα που προάγει τις διασυνδέσεις γραμμικών πολυμερών, και έναν καταλύτη. Η προκύπτουσα μήτρα πηκτής παρέχει ένα πορώδες περιβάλλον για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πρωτεΐνης για ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα αποδιατάσσονται και αποσυναρμολογούνται στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές υπομονάδες τους χρησιμοποιώντας κατάλληλους αναγωγικούς παράγοντες όπως β -μερκαπτοαιθανόλη και SDS, που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli. Η β -μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους πρωτεϊνικούς δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ το SDS καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και συνδέεται μη ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες, προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών διαταράσσεται, με αποτέλεσμα παρόμοιες αναλογίες φορτίου/μέγεθος.

Τα δείγματα πρωτεΐνης στη συνέχεια φορτώνονται στην πηκτή, από την οποία μετά διαπερνά ηλεκτρικό ρεύμα, χρησιμοποιώντας μια συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης. Τα αρνητικώς φορτισμένα σύμπλοκα SDS-πολυπεπτιδίου κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο, περνώντας μέσα από την πορώδη πηκτή «επιστοίβαξης» και κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού.

Η πηκτή διαχωρισμού έχει υψηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου από την πηκτή επιστοίβαξης, επιτρέποντας καλύτερη ανάλυση των ζωνών πρωτεΐνης με βάση το μέγεθός τους.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες τυπικά χρωματίζονται με χρώση της πηκτής με κατάλληλη χρωστική ουσία, όπως χρώση Coomassie Brilliant Blue ή αργύρου. Οι πρωτεϊνικές ζώνες μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν για να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που ενδιαφέρουν. Αυτό μπορεί να γίνει συγκρίνοντας το πρότυπο μετανάστευσης των ζωνών πρωτεΐνης με γνωστά πρότυπα ή με μεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη για ανοσοαποτύπωση.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδιος αποτελείται από 2 διακριτά μέρη:

- **Πηκτή επιστοίβαξης, Stacking gel 5%:** σκοπός της είναι να στοιβάξει τις πρωτεΐνες, ώστε να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση από το ίδιο σημείο

- **Πηκτή διαχωρισμού, Separation gel 10-15%:** σκοπός της είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών

Πίνακας 2 : Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE

Πηκτή διαχωρισμού	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
Acryl : bis (29:1)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml	0,67 ml
1.5M Tris pH = 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5	2,5	-
1M Tris pH = 6.8	-	-	-	-	0,5 ml
H ₂ O	4,6 ml	4 ml	3,3 ml	2,3 ml	2,7 ml
10% SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	40 μl
10% APS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	40 μl
TEMED	6 μl	4 μl	4 μl	4 μl	4 μl
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

3.1.15 Μεταφορά των Πρωτεϊνών σε Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης

Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρείται από τη συσκευή μεταφοράς και ξεπλένεται με TBS (ρυθμιστικό διάλυμα Tris) για να αφαιρεθεί τυχόν υπολειμματικό ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η μεμβράνη στη συνέχεια μπλοκάρεται με ένα διάλυμα αποκλεισμού (π.χ. 5% ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά σε TBS-Tween) για να αποτραπεί η μη ειδική δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που ενδιαφέρει, για μια χρονική περίοδο (συνήθως μερικές ώρες έως όλη τη νύχτα) με ήπια ανάδευση. . Μετά το πλύσιμο με TBS-Tween για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου πρωτογενούς αντισώματος, η μεμβράνη επωάζεται με ένα δευτερεύον αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρωτεΐον αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένη με ένα ένζυμο όπως η υπεροξειδάση αγριοραπανιού (HRP) ή η αλκαλική φωσφατάση (AP). Μετά το πλύσιμο για την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένου δευτερογενούς αντισώματος, η μεμβράνη αναπτύσσεται με ένα υπόστρωμα για το ένζυμο, το οποίο παράγει ένα ορατό σήμα (π.χ. χημειοφωταύγεια ή χρωματομετρική αντίδραση), επιτρέποντας την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης που ενδιαφέρει.

3.1.16 Επώαση της Μembrάνης με Ειδικά Αντισώματα και Ανίχνευση των Πρωτεϊνών

Μετά το στάδιο αποκλεισμού, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (συνήθως ρυθμισμένο με Tris αλατούχο διάλυμα-Tween (TBS-T) ή ρυθμισμένο με φωσφορικά αλατούχο διάλυμα-Tween (PBS-T)) για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο (συνήθως 1-2 ώρες). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, το πρωτεύον αντίσωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη πλένεται αρκετές φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα για να αφαιρεθούν τυχόν μη δεσμευμένα πρωτογενή αντισώματα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρωτεύον αντίσωμα και συζευγνύεται με το ένζυμο HRP. Η μεμβράνη πλένεται ξανά για να αφαιρεθούν τυχόν μη δεσμευμένα δευτερεύοντα αντισώματα.

Τέλος, η ανίχνευση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με επώαση της μεμβράνης με υπόστρωμα χημειοφωταύγειας για μικρό χρονικό διάστημα. Το ένζυμο HRP καταλύει την οξείδωση του υποστρώματος, η οποία παράγει φως. Το εκπεμπόμενο φως στη συνέχεια συλλαμβάνεται σε ένα φωτογραφικό φιλμ ή χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο σύστημα απεικόνισης, επιτρέποντας την οπτικοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης που ενδιαφέρει.

Η διαδικασία για την επώαση της μεμβράνης με αντισώματα περιλαμβάνει διάφορα στάδια για να διασφαλιστεί ότι τα πρωτογενή και δευτερεύοντα αντισώματα συνδέονται ειδικά με την επιθυμητή πρωτεΐνη στη μεμβράνη. Το διάλυμα γάλακτος χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισωμάτων και το διάλυμα TBS-T χρησιμοποιείται για την πλύση της μεμβράνης και την απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένων αντισωμάτων. Το πρωτογενές αντίσωμα στη συνέχεια επωάζεται με τη μεμβράνη, ακολουθούμενα από περισσότερες πλύσεις και επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο HRP.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας με ένα συγκεκριμένο κιτ. Η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα υποστρώματος και στη συνέχεια τοποθετείται ένα φωτογραφικό φιλμ στην κορυφή της μεμβράνης για να συλλάβει το φως που παράγεται από το ένζυμο HRP. Το φιλμ στη συνέχεια αναπτύσσεται και στερεώνεται για να αποκαλύψει τις λωρίδες που αντιστοιχούν στην επιθυμητή πρωτεΐνη. Μετά τη διαδικασία ανίχνευσης, η μεμβράνη στεγνώνει και αποθηκεύεται στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.1.17 Ανοσοκυτταροχημεία

Η ανοσοκυτταροχημεία (ICC) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ειδικά για την ανίχνευση και την οπτικοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή άλλων μορίων σε καλλιεργημένα κύτταρα που έχουν στερεωθεί σε μια πλάκα μικροσκοπίου. Το ICC χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες κυτταροκαλλιέργειας για τον προσδιορισμό του εντοπισμού και της κατανομής συγκεκριμένων μορίων εντός των κυττάρων.

Η τεχνική ICC περιλαμβάνει πολλά βήματα. Αρχικά, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου και στη συνέχεια στερεώνονται για να διατηρηθεί η δομή τους και η θέση των μορίων που ενδιαφέρουν. Στη συνέχεια, πρωτογενή αντισώματα που είναι ειδικά για το αντιγόνο στόχο προστίθενται στο δείγμα. Τα πρωτογενή αντισώματα θα δεσμευτούν στο αντιγόνο στόχο εάν υπάρχει στο δείγμα. Αφού ξεπλυθούν τα μη δεσμευμένα πρωτογενή αντισώματα, ένα δευτερεύον αντίσωμα που είναι σημασμένο με ανιχνεύσιμη ετικέτα, όπως ένα ένζυμο ή φθορίζουσα χρωστική, προστίθεται στο δείγμα. Τα επισημασμένα δευτερεύοντα αντισώματα θα συνδεθούν με το πρωτεύον αντίσωμα, το οποίο είναι ήδη συνδεδεμένο με το αντιγόνο στόχο. Η ανιχνεύσιμη ετικέτα μπορεί στη συνέχεια να οπτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας μια κατάλληλη μέθοδο ανίχνευσης.

Το ICC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του εντοπισμού και της κατανομής ενός ευρέος φάσματος μορίων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και υδατανθράκων, σε καλλιεργημένα κύτταρα. Το ICC είναι μια ισχυρή τεχνική για τον εντοπισμό της παρουσίας και της θέσης συγκεκριμένων μορίων σε βιολογικά δείγματα, ιδιαίτερα στο πλαίσιο μελετών κυτταροκαλλιέργειας. Μπορεί επίσης να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές, όπως συνεστιακή μικροσκοπία ή κυτταρομετρία ροής, για να ληφθούν πιο λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με το δείγμα.

****Στατιστική ανάλυση**

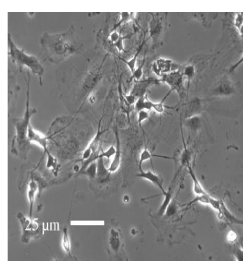
Η στατιστική ανάλυση των αριθμητικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test. Η στατιστική σημαντικότητα (p value) σε κάθε περίπτωση παρουσιάζεται με αστερίσκους και ειδικότερα, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ και *** = $p < 0,001$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

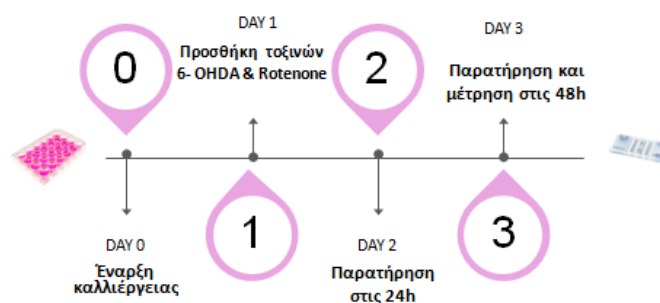
ΜΕΡΟΣ 1: Προσθήκη τοξινών που δυσχεραίνουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων στη νευροβλαστωματική σειρά και ICC

Προσθήκη 6-OHDA και Ροτενόνης στη κυτταρική σειρά Be2c

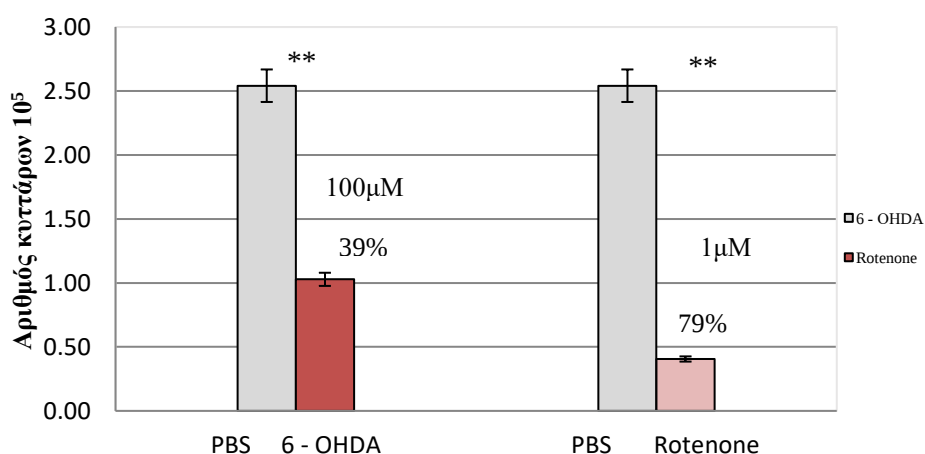
Η διαδικασία για την προσθήκη τοξινών 6-OHDA και Ροτενόνη στην κυτταρική σειρά Be2c έγινε με επίστρωση 150.000 κύτταρα/φρεάτιο. Στις 24 ώρες από την προσθήκη των τοξινών στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε η πρώτη (1^η) παρατήρηση των κυττάρων και μετά το πέρας των 48 ωρών πραγματοποιήθηκε η δεύτερη (2^η) παρατήρηση και έπειτα η (1^η) μέτρηση των κυττάρων.



Κυτταρική σειρά Be2c



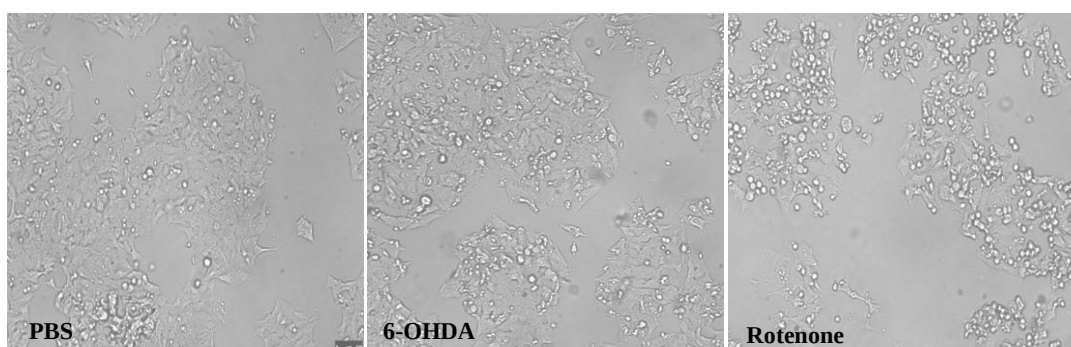
Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.



Σχήμα 1. Η επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση στις τοξίνες 6-OHDA και Ροτενόνη για 48 h.

Παρατηρείται πως τα δυο φάρμακα είναι δραστικά στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις, καθώς η 6-OHDA σε συγκέντρωση 100 μM μειώνει δυο φορές τον αριθμό των κυττάρων και η Ροτενόνη σε συγκέντρωση 1 μM μειώνει πέντε φορές τον αριθμό των κυττάρων. Συνεπώς, η Ροτενόνη προκαλεί αυξημένα ποσοστά θανάτου στις επιλεγμένες συνθήκες.

1^η Παρατήρηση : 6-OHDA και Ροτενόνη (24 h)



Εικόνα 37. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c μετά από έκθεση σε τοξίνες 6 – OHDA και Ροτενόνη για 24 h

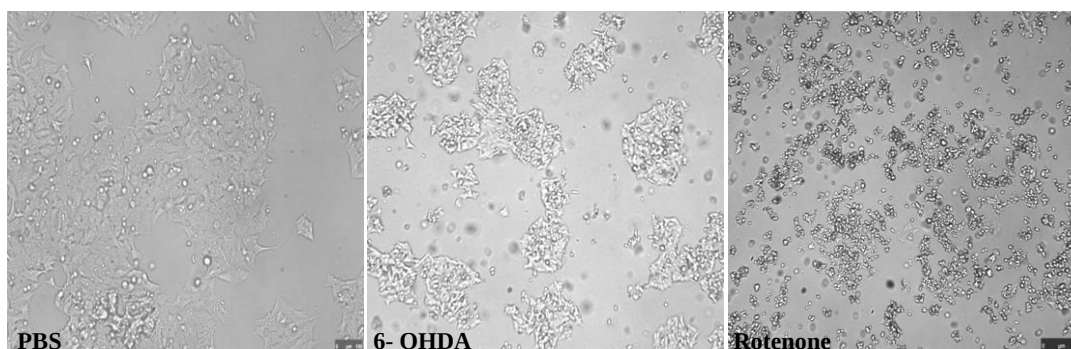
Μορφολογία κυττάρων (24 h) :

PBS: Η μορφολογία των κυττάρων είναι φυσιολογική

6-OHDA: Παρατηρούνται πεπλατυσμένα και ασχημάτιστα κύτταρα ενώ για την

Ροτενόνη: Παρατηρείται αυξημένος αριθμός σφαιρικών και μικρών κυττάρων

2^η Παρατήρηση : 6-OHDA και Ροτενόνη (48 h)



Εικόνα 38. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c μετά από έκθεση σε τοξίνες 6 – OHDA και Ροτενόνη για 48 h

Μορφολογία κυττάρων (48 h) :

PBS: Η μορφολογία των κυττάρων είναι φυσιολογική

6-OHDA: Παρατηρούνται πεπλατυσμένα και ασχημάτιστα κύτταρα ενώ για την

Ροτενόνη: Παρατηρείται αυξημένος αριθμός σφαιρικών και μικρών κυττάρων

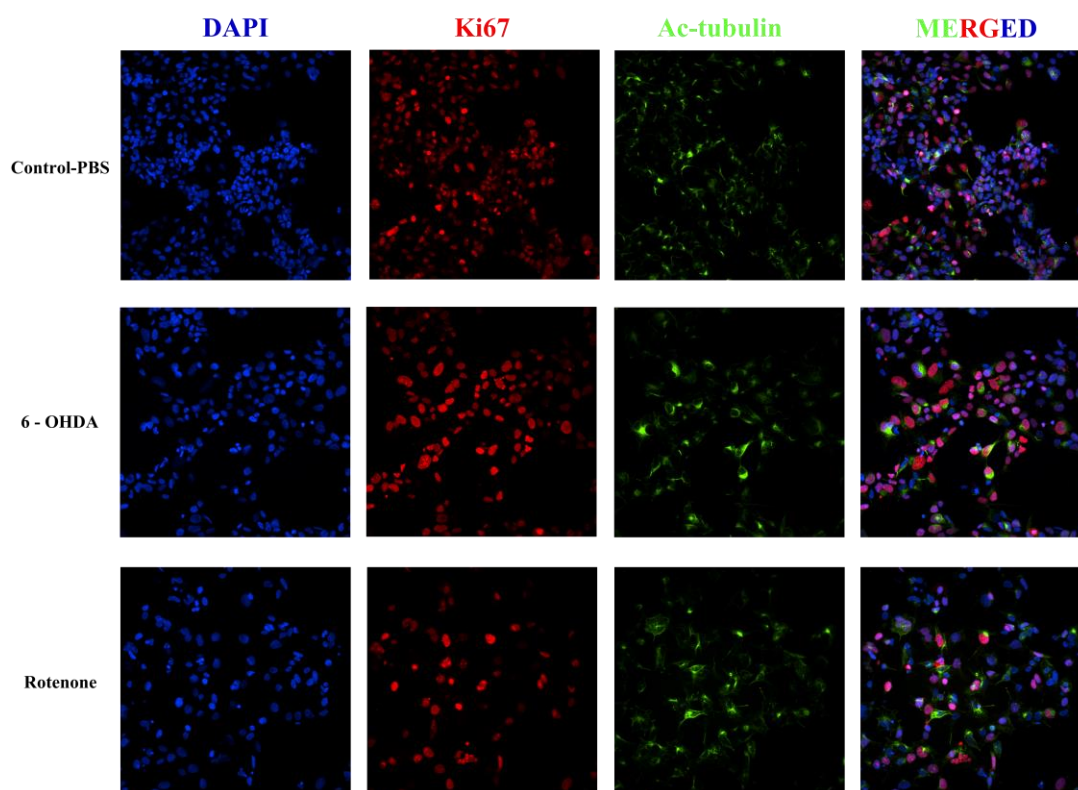
Ποσοστό (%) νεκρών κυττάρων : 6 –OHDA : 30% / Ροτενόνη : 50%

Επίσης, θέλαμε να αξιολογήσουμε το κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την δυναμική των μικροσωληνίσκων, χρησιμοποιώντας:

Τον δείκτη **Ki67**, ο οποίος αφορά μια πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης πολλαπλασιασμού. Παίζει κρίσιμο ρόλο στην αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης δραστηριότητας κυτταρικής διαίρεσης..

Και την **Ac – tubulin** (ακετυλιωμένη τουμπουλίνη) αντίστοιχα που είναι δείκτης για τη μελέτη της δυναμικής των μικροσωληνίσκων και των κυτταρικών διεργασιών που βασίζονται στη λειτουργία των μικροσωληνίσκων.

ICC – Drug Treatment



Εικόνα 39. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν στις τοξίνες 6- OHDA και Ροτενόνη με αντισώματα **Ki67** και **Ac – tubulin**.

Μετά την επώαση με τα φάρμακα διακρίνεται :

- Αύξηση στο μέγεθος των κυττάρων και μια γενικότερη αλλαγή στη μορφολογία τους
- Μείωση του αριθμού των κυττάρων
- Αλλαγή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

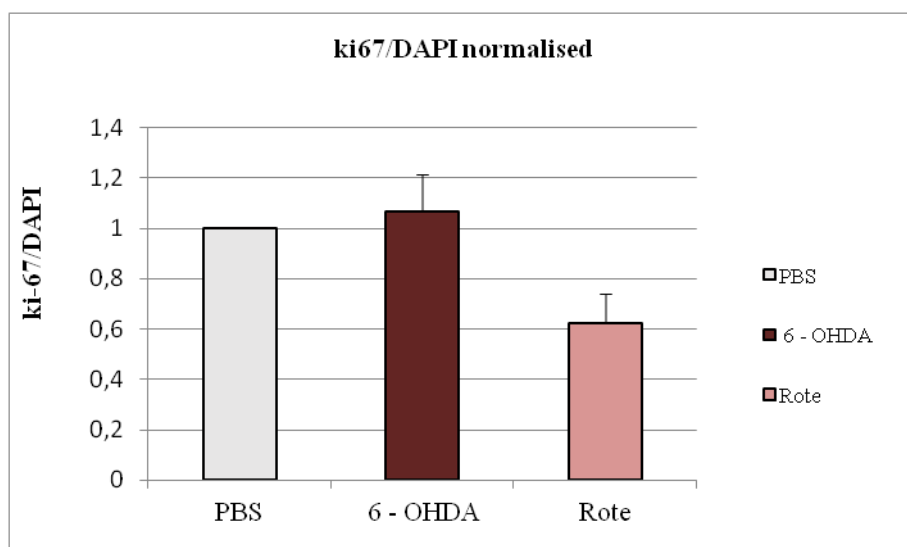
Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

6-OHDA

- Αύξηση των κυττάρων στην φάση S → Δυσκολία στην σύνθεση του DNA
- Εμφάνιση αποπτωτικών πυρήνων

Ροτενόνη

- Εντονότερη μείωση των ki67⁺ κυττάρων → Αύξηση κυττάρων στην G0 φάση
- Εμφάνιση περισσότερων αποπτωτικών πυρήνων

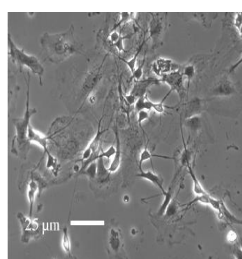


Σχήμα 2. Ο αριθμός των κυττάρων Ki 67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων - πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στις τοξίνες 6- OHD και Ροτενόνη.

ΜΕΡΟΣ 2: Προσθήκη εκχυλίσμάτων στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και ICC

Προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* στη κυτταρική σειρά Be2c

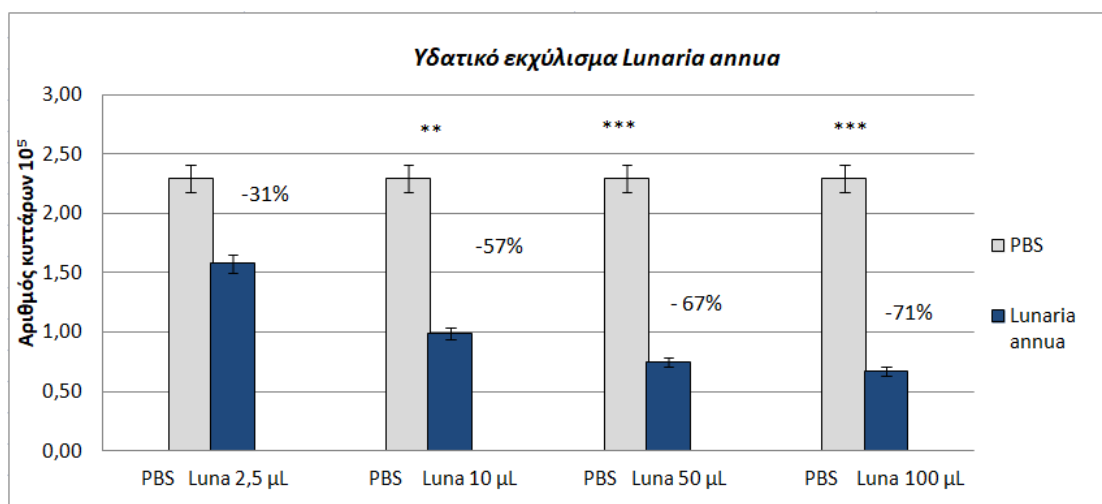
Η διαδικασία για την προσθήκη του εκχυλίσματος στην κυτταρική σειρά Be2c έγινε με επίστρωση 150.000 κύτταρα/ φρεάτιο και με 450.000 κύτταρα/φρεάτιο. Στις 24 ώρες από την προσθήκη του εκχυλίσματος στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε η πρώτη (1^η) παρατήρηση των κυττάρων και μετά το πέρας των 48 ωρών πραγματοποιήθηκε η δεύτερη (2^η) παρατήρηση και έπειτα η (1^η) μέτρηση των κυττάρων.



Κυτταρική σειρά Be2c



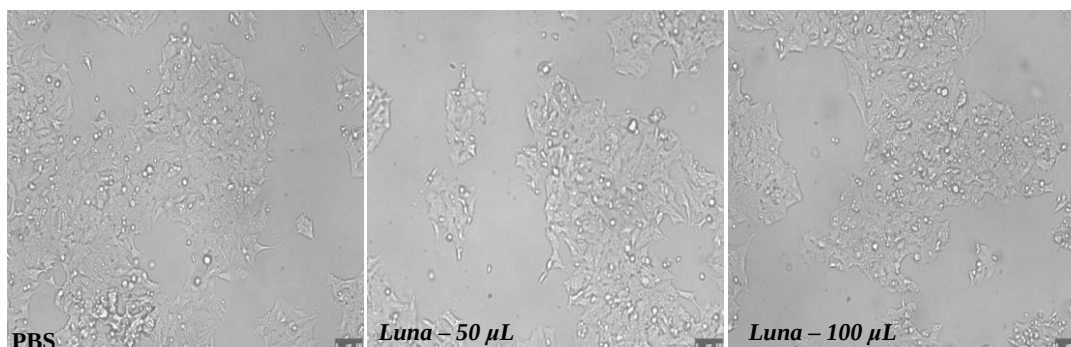
Εικόνα 40. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος *Lunaria annua* στη κυτταρική σειρά Be2c.



Σχήμα 3. Επίδραση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση σε υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος *Lunaria annua* για 48 h.

Στα αποτελέσματα των μετρήσεων στις 48 ώρες παρατηρήθηκε πως με την αύξηση του όγκου του υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* που προστίθεται στα κύτταρα, μειώνεται αισθητά ο αριθμός των κυττάρων.

1^η Παρατήρηση – *Lunaria annua* (24 h)



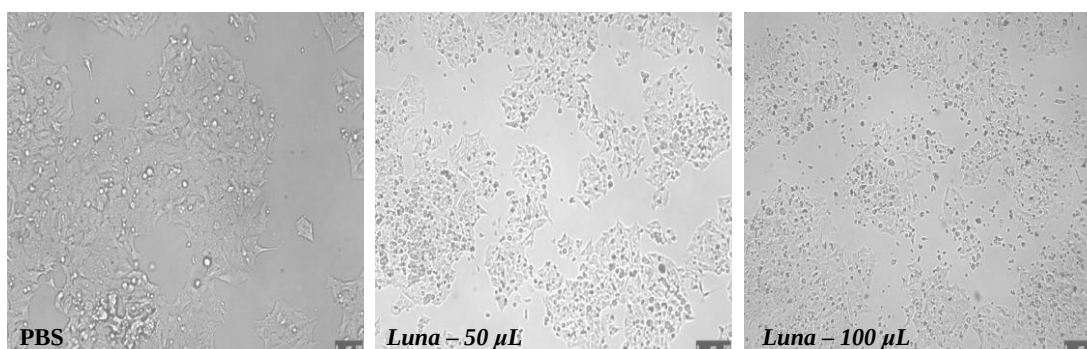
Εικόνα 41. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα πετάλων *Lunaria annua* για 24 h

Μορφολογία κυττάρων (24 h):

PBS : Η μορφολογία των κυττάρων είναι φυσιολογική

***Lunaria annua* (50 και 100 μ L) :** Παρατηρείται αυξημένος αριθμός σφαιρικών και μικρών κυττάρων

2^η Παρατήρηση – *Lunaria annua* (48 h)



Εικόνα 42. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα *Lunaria annua* για 48 h

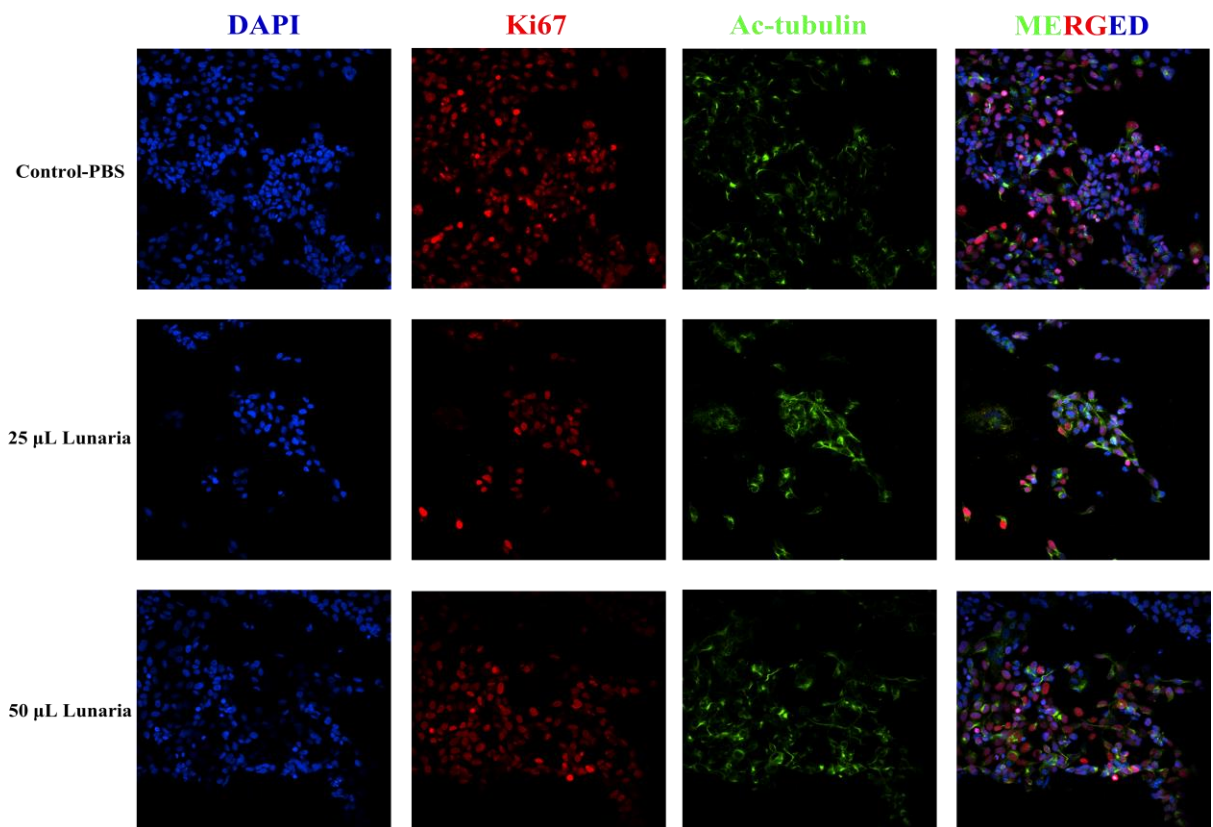
Μορφολογία κυττάρων (48 h) :

PBS : Η μορφολογία των κυττάρων είναι φυσιολογική

Lunaria annua* (50 και 100 μ L)**: Παρατηρείται αυξημένος αριθμός σφαιρικών και μικρών κυττάρων. Συνεπώς η ***Lunaria επάγει στα κύτταρα αυξημένα ποσοστά θανάτου

Ποσοστό (%) νεκρών κυττάρων : *Lunaria annua* 50 μ L : 20% - *Lunaria annua* 100 μ L : 40%

ICC – *Lunaria annua* (25 και 50 μ L)



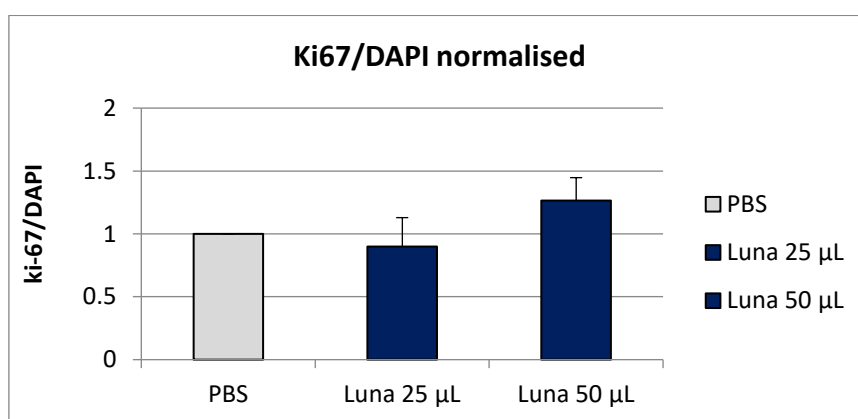
Εικόνα 43. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν στα 25 και 50 μ L με αντισώματα Ki67 και Ac – tubulin.

Μετά την επώαση με το εκχύλισμα από το φυτό *Lunaria annua* παρατηρείται:

- Αύξηση στο μέγεθος των κυττάρων και μια γενικότερη αλλαγή στη μορφολογία τους
- Μείωση του αριθμού των κυττάρων
- Αλλαγή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

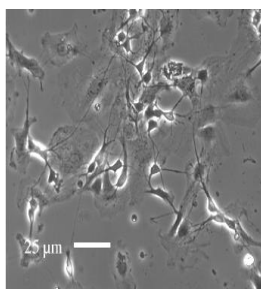
- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση S του κυτταρικού κύκλου → Δυσκολία σύνθεσης DNA



Σχήμα 4. Ο αριθμός των κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων - πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της *Lunaria annua* στα 25 και 50 µL.

Προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* στη κυτταρική σειρά Be2c

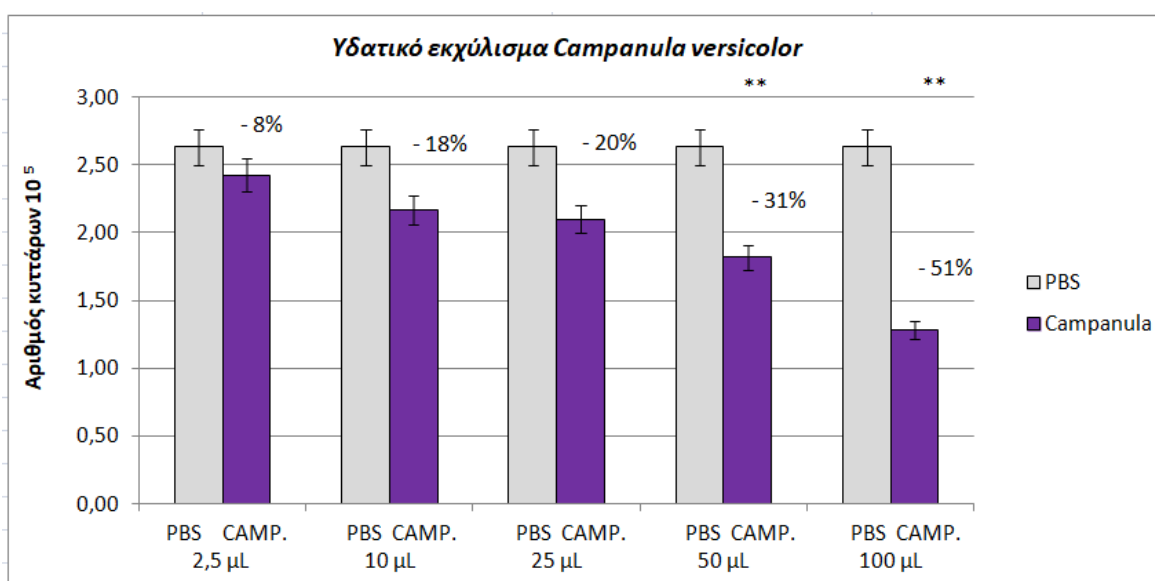
Η διαδικασία για την προσθήκη του εκχυλίσματος στην κυτταρική σειρά Be2c έγινε με επίστρωση 150.000 κυττάρων/φρεάτιο και 450.000 κυττάρων/φρεάτιο. Στις 24 ώρες από την προσθήκη του εκχυλίσματος στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε η πρώτη (1^η) παρατήρηση των κυττάρων και μετά το πέρας των 48 ωρών πραγματοποιήθηκε η δεύτερη (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση.



Κυτταρική σειρά Be2c



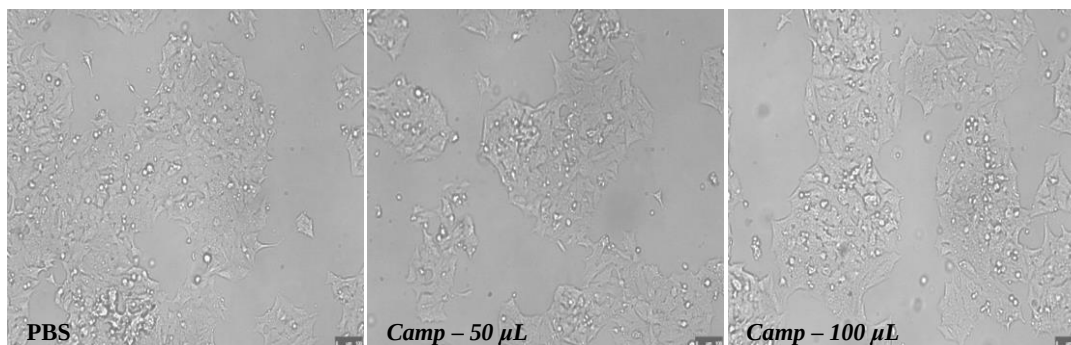
Εικόνα 44. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος πετάλων *Campanula versicolor* στη κυτταρική σειρά Be2c.



Σχήμα 5. Επίδραση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό της σειράς Be2c μετά από την έκθεση σε υδατικό εκχύλισμα πετάλων *Campanula versicolor* για **48 h**.

Στα αποτελέσματα των μετρήσεων στις 48 ώρες παρατηρήθηκε πως με την αύξηση του όγκου του υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* που προστίθεται στα κύτταρα, μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων.

1^η Παρατήρηση – *Campanula versicolor* (24 h)

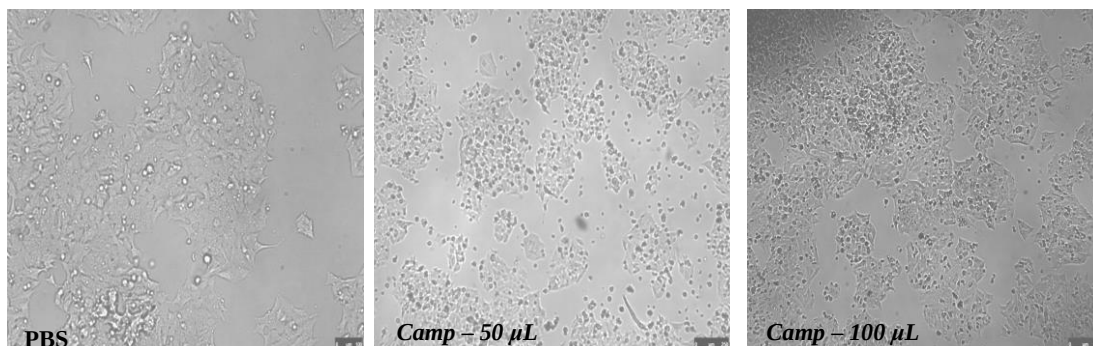


Εικόνα 45. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα *Campanula versicolor* για 24 h

Μορφολογία κυττάρων (24 h) :

Για το **PBS** και την *Campanula versicolor* στα 50 µL και 100 µL αντίστοιχα η μορφολογία των κυττάρων είναι φυσιολογική

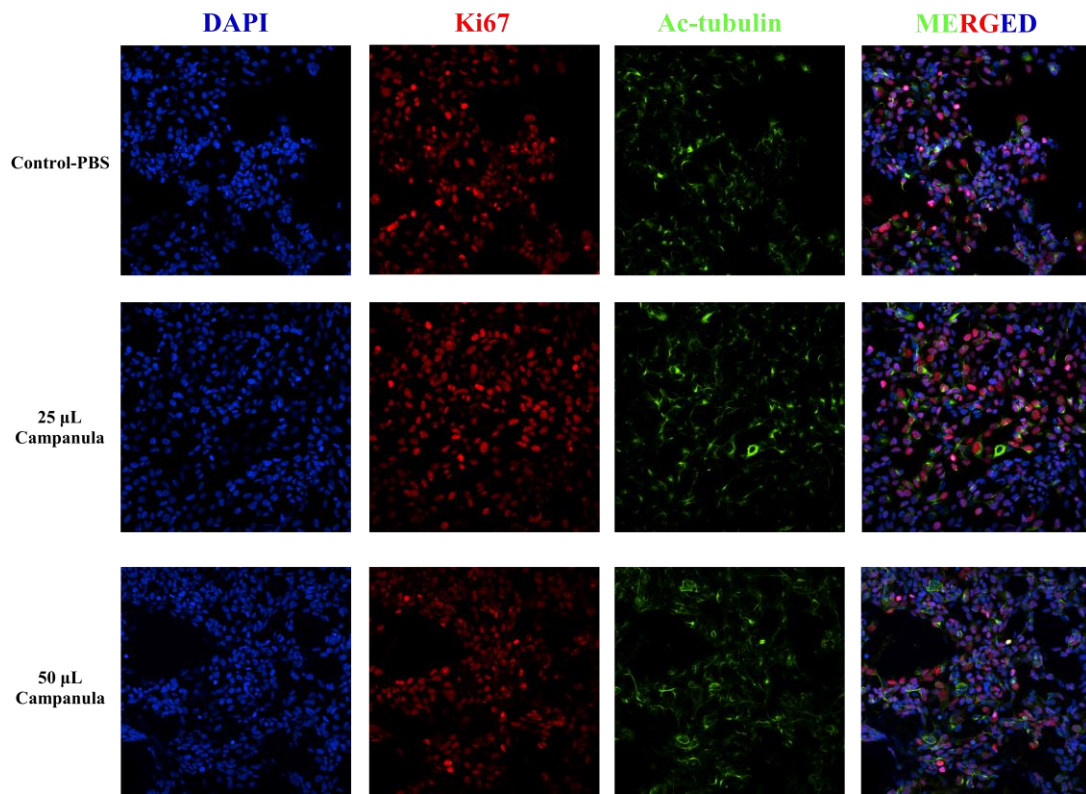
2^η Παρατήρηση – *Campanula versicolor* (48 h)



Εικόνα 46. Μορφολογία νευροβλαστωματικής σειράς Be2c σε υδατικό εκχύλισμα *Campanula versicolor* για 48 h

Μορφολογία κυττάρων (48 h): Φυσιολογική

Ποσοστό (%) νεκρών κυττάρων : (Camp. 50 µL) ~ 5% και (Camp.100 µL) ~ 10 – 15%



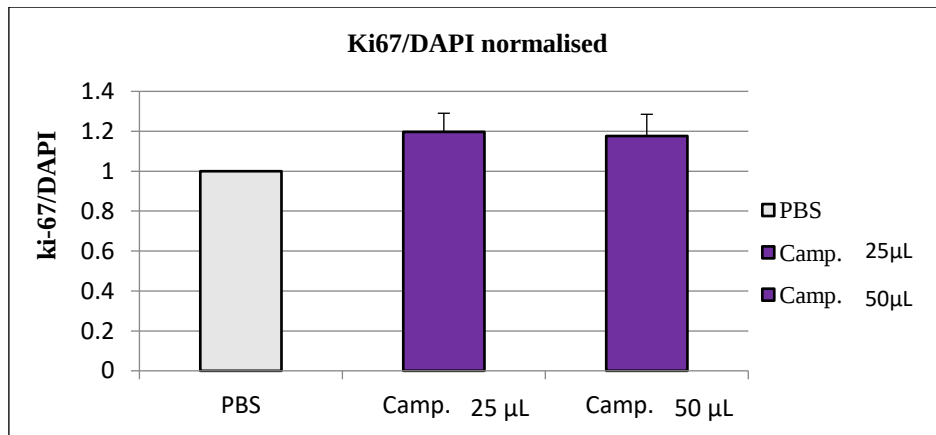
Εικόνα 47. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε 25 και 50 μ L υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.

Μετά την επώαση με το εκχύλισμα από το φυτό *Campanula versicolor*:

- Αλλαγή στην κατανομή της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση S/G2 του κυτταρικού κύκλου το οποίο φαίνεται να γίνεται εντονότερο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος
- Μικρή αύξηση στα Ki67⁺ κύτταρα
- Στα 50 μ L εκχυλίσματος παρατηρείται και η εμφάνιση αποπτωτικών πυρήνων



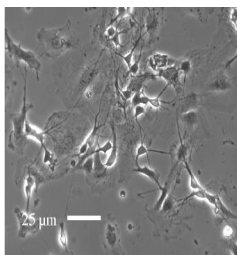
Σχήμα 6. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχυλίσμα της *Campanula versicolor* στα 25 και 50 µL.

ΜΕΡΟΣ 2: Χρήση των τοξινών 6-OHDA και Ροτενόνης ως παραγόντων στρες και μελέτη των επιπτώσεων τους στη κυτταρική σειρά Be2c σε συνδυασμό με τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* και ICC

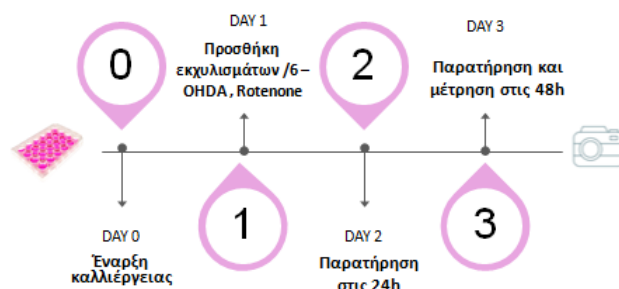
Προσθήκη υδατικού Εκχυλίσματος *Lunaria annua* στη Νευροβλαστωματική Κυτταρική Σειρά Be2C Παρουσία των Νευροτοξικών Ενώσεων 6-OHDA και Ροτενόνη

Η διαδικασία για την προσθήκη του υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* στην κυτταρική σειρά Be2c έγινε με επίστρωση 150.000 κυττάρων/φρεάτιο. Επιλέχθηκαν δύο τοξικές ενώσεις η 6-OHDA και η Ροτενόνη. Τόσο η 6-υδροξυντοπαμίνη όσο και η ροτενόνη χρησιμοποιούνται συνήθως στην εργαστηριακή έρευνα για την πρόκληση συγκεκριμένων πειραματικών μοντέλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η νόσος του Πάρκινσον.

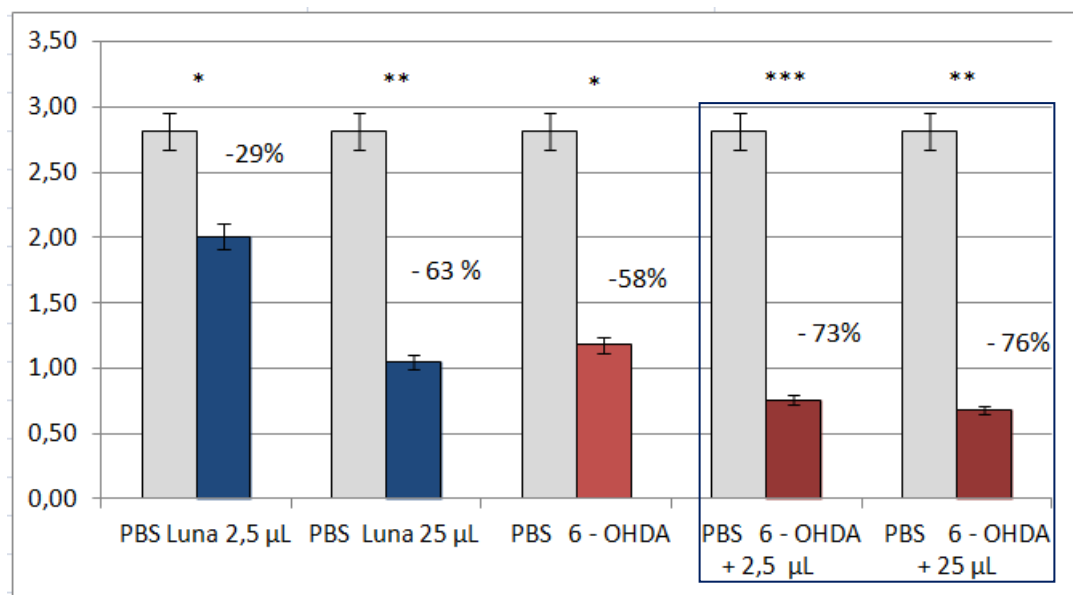
Στη συνθήκη με 6-OHDA 100 µM έγινε προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* 2,5 µL και 25 µL. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε η (1^η) παρατήρηση και στις 48 ώρες από την προσθήκη της τοξίνης και του εκχυλίσματος πραγματοποιείται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c



Κυτταρική σειρά Be2c



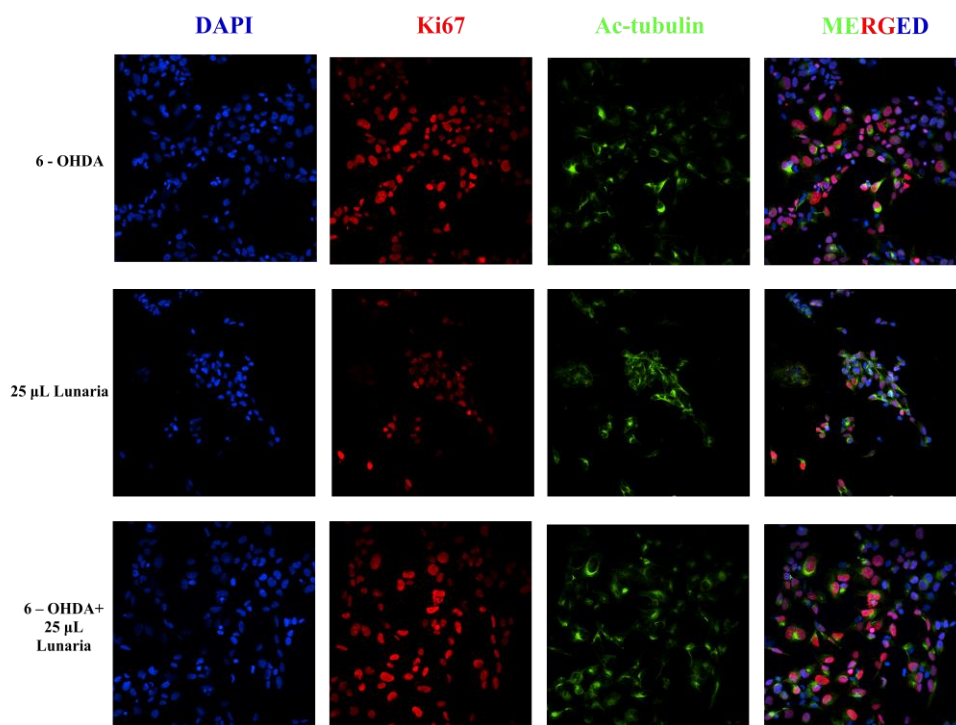
Εικόνα 48. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος *Lunaria annua* σε συνδυασμό με τις τοξίνες στη κυτταρική σειρά Be2c.



Σχήμα 7. Χρήση 6 - OHDA στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* για 48 h.

Παρατηρείται πως η *Lunaria annua* έχει συνεργατική δράση με το φάρμακο 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 2,5 και 25 µL. Παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων.

ICC → 6-OHDA και *Lunaria annua* (25 µL)



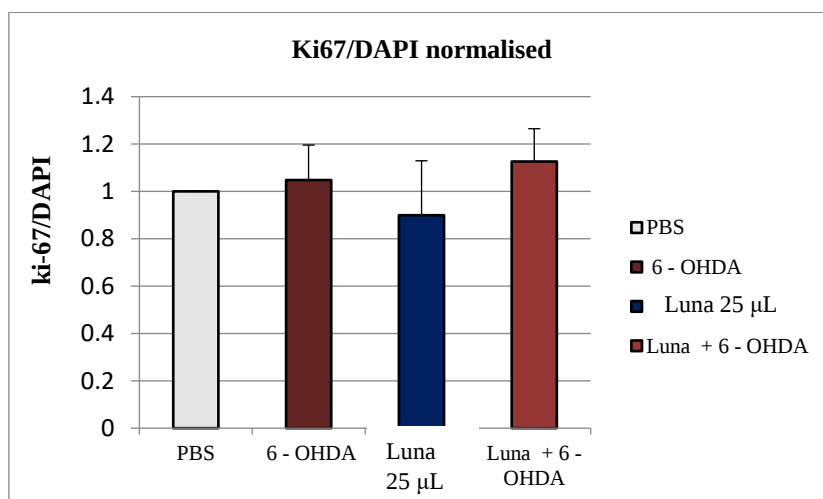
Εικόνα 49. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος *Lunaria annua* (25 µL) και 6-OHDA με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.

Μετά την επώαση των κυττάρων με τον συνδυασμό εκχυλίσματος και 6-OHDA:

- Εντονότερα στρεσαρισμένα κύτταρα συγκριτικά με τα control
- Έντονη μεταβολή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

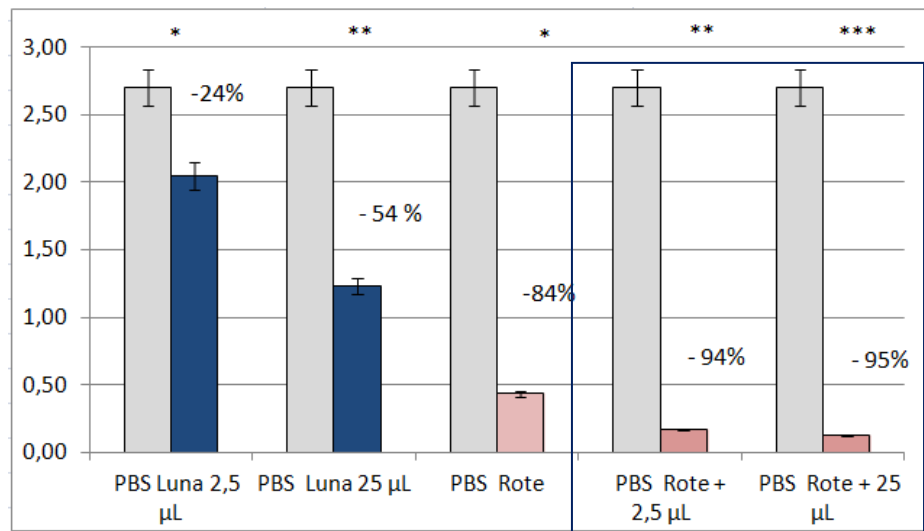
- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση S του κυτταρικού κύκλου → Δυσκολία σύνθεσης DNA
- Εμφανώς μειωμένος αριθμός των Ki67⁺ κυττάρων → Αύξηση κυττάρων στην G0 φάση
- Αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών πυρήνων



Σχήμα 8. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της *Lunaria annua* σε συνδυασμό με την τοξίνη 6-OHDA.

Στη συνθήκη με την τοξίνη Ροτερόνη 1 µM έγινε προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* 2,5 µL και 25 µL. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε η (1^η)

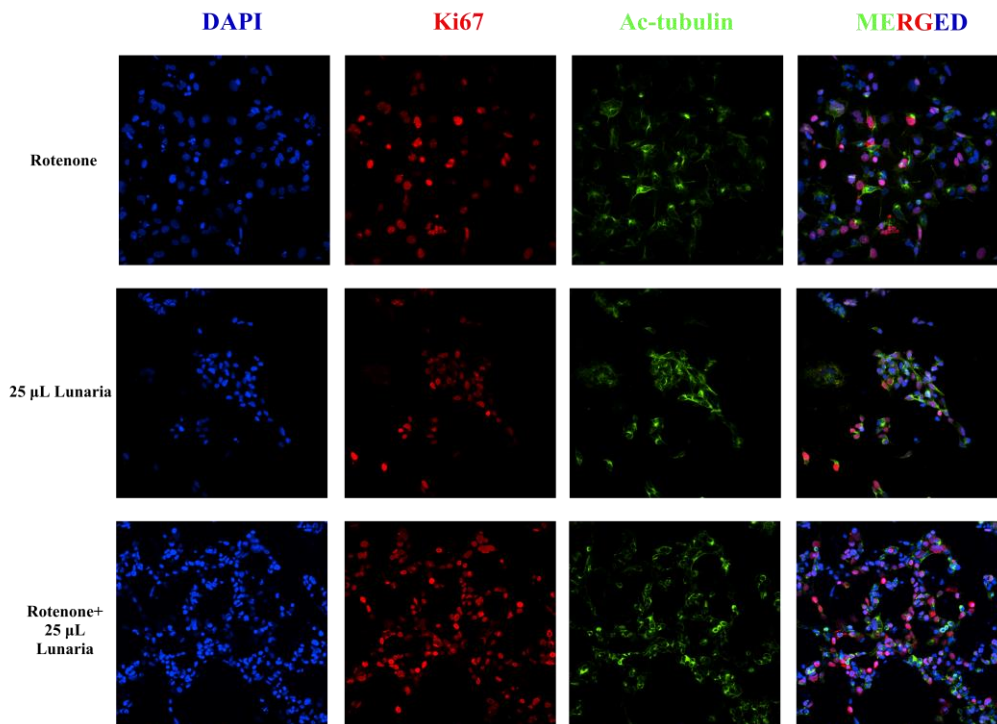
παρατήρηση και στις 48 ώρες από την προσθήκη της τοξίνης και του εκχυλίσματος πραγματοποιείται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.



Σχήμα 9. Χρήση Ροτενόνης στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua* για 48 h.

Παρατηρείται πως η *Lunaria annua* έχει συνεργατική δράση με το φάρμακο 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 2,5 και 25 μL. Παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων.

ICC - Rotenone και *Lunaria annua* (25 μL)



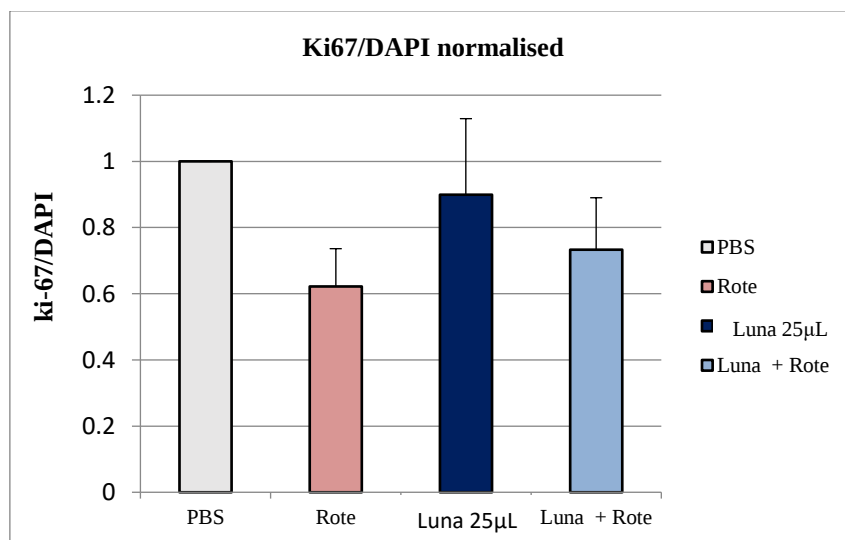
Εικόνα 50. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος *Lunaria annua* (25 μL) και Ροτενόνη με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.

Μετά την επώαση των κυττάρων με των **συνδυασμό εκχυλίσματος και Ροτενόνη** :

- Εντονότερα στρεσαρισμένα κύτταρα συγκριτικά με τα control
- Απώλεια φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων → Σφαιρικά και μικρά κύτταρα
- Έντονη μεταβολή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

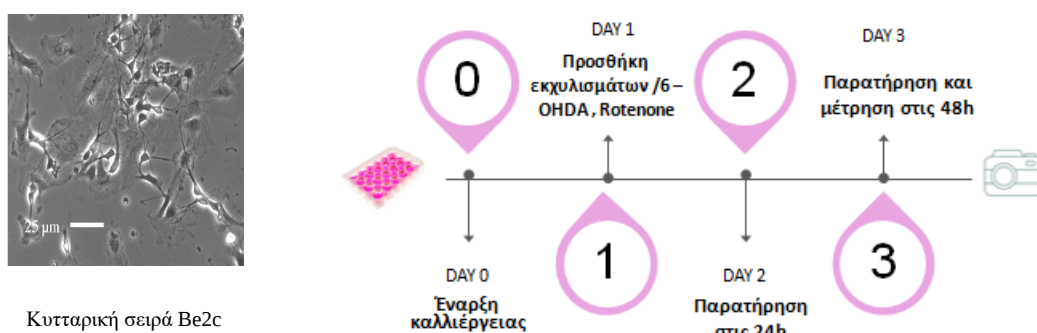
- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση S του κυτταρικού κύκλου → Διακοπή σύνθεσης DNA
- Αύξηση του αριθμού των Ki67⁺ κυττάρων → Μειωμένος αριθμός κυττάρων στην G0 φάση
- Αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών πυρήνων



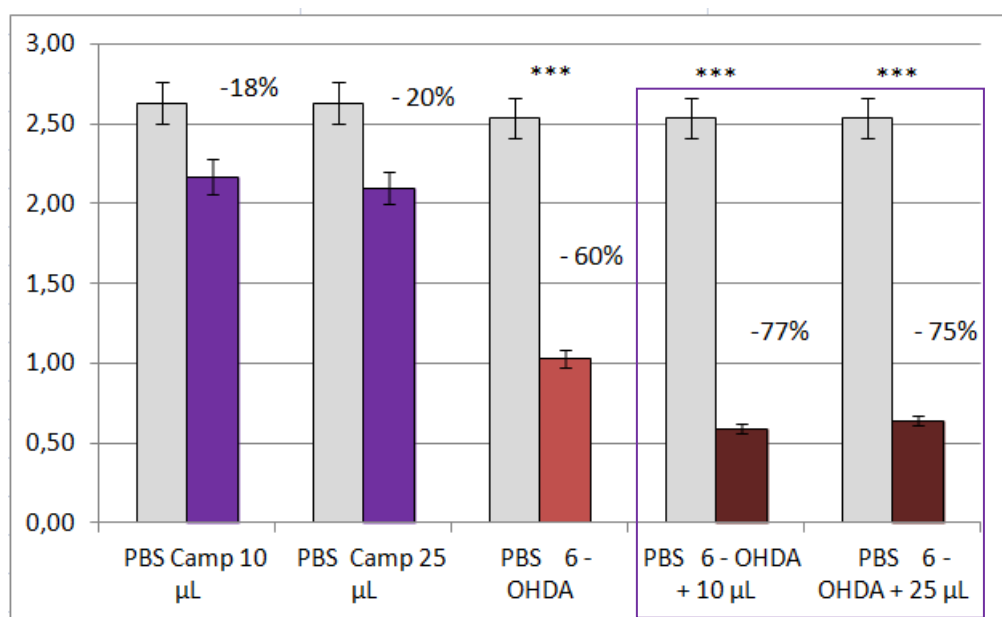
Σχήμα 10. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της *Lunaria annua* σε συνδυασμό με την τοξίνη Ροτενόνη.

Προσθήκη υδατικού Εκχυλίσματος *Campanula versicolor* στη Νευροβλαστωματική Κυτταρική Σειρά Be2C Παρουσία των Νευροτοξικών Ενώσεων 6-OHDA και Ροτενόνη

Η διαδικασία για την προσθήκη του υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* στην κυτταρική σειρά Be2C έγινε με επίστρωση 150.000 κύτταρα/φρεάτιο. Στη συνθήκη με 100 μ M 6-υδροξυνοτοπαμίνης έγινε προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* 10 μ L και 25 μ L. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε η (1^η) παρατήρηση και στις 48 ώρες από την προσθήκη της τοξίνης και του εκχυλίσματος πραγματοποιείται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.



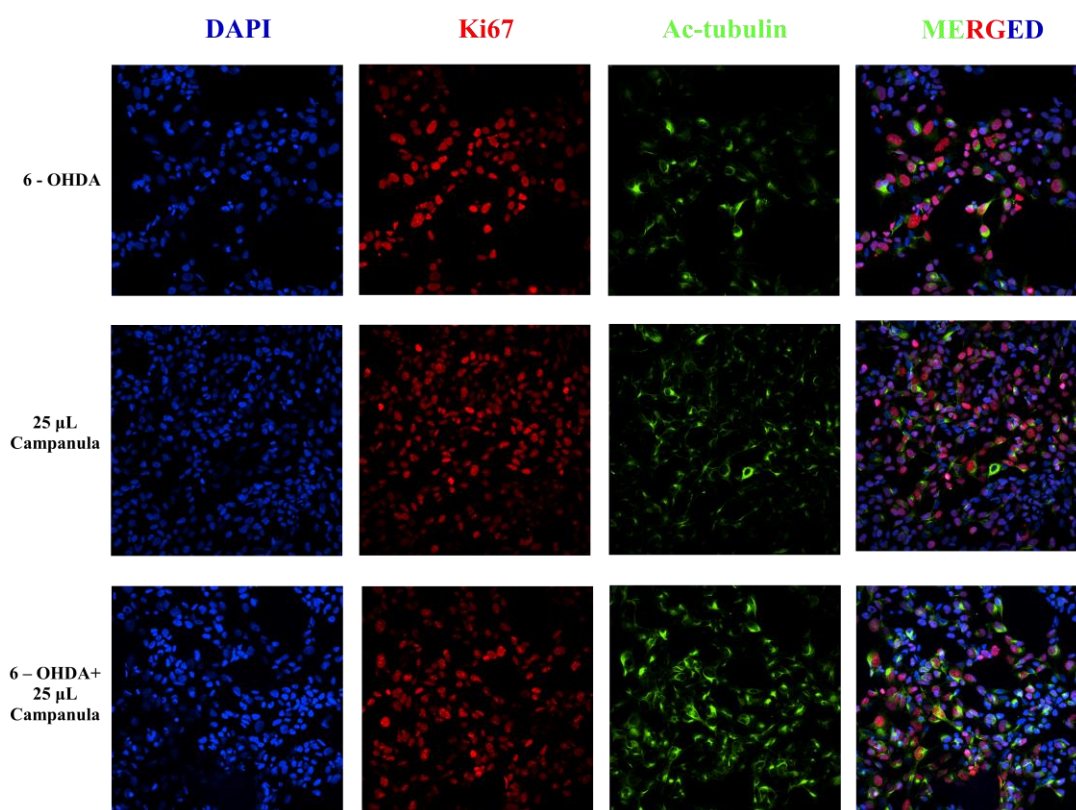
Εικόνα 51. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος *Campanula versicolor* σε συνδυασμό με τις τοξίνες στη κυτταρική σειρά Be2c.



Σχήμα 11. Χρήση 6- OHDA στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* για 48 h.

Παρατηρείται μείωση στον αριθμό κυττάρων 10 και 25 μL και η *Campanula versicolor* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (6 – OHDA) στις συγκεντρώσεις 10 και 25 μL .

ICC → 6-OHDA και *Campanula versicolor* (25 μL)



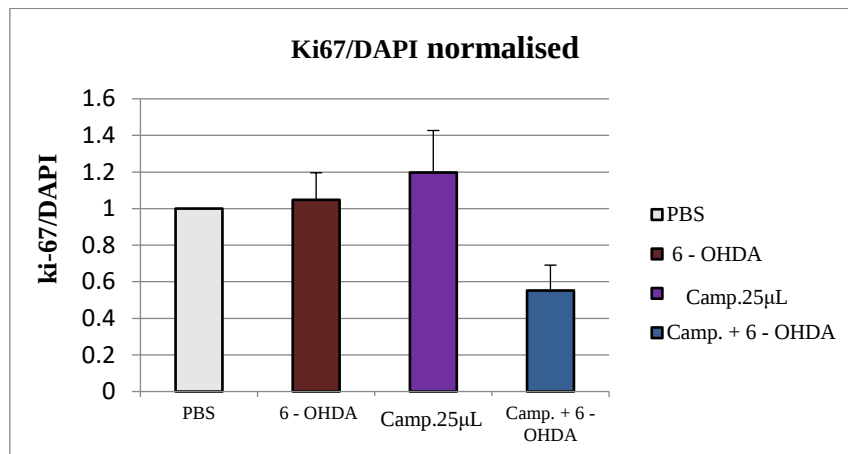
Εικόνα 52. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό εκχυλίσματος *Campanula versicolor* (25 μL) 6-OHDA με αντισώματα κατά Ki67 και Ac – tubulin.

Μετά την επώαση των κυττάρων με τον **συνδυασμό εκχυλίσματος και 6-OHDA:**

- Εντονότερα στρεσαρισμένα κύτταρα συγκριτικά με τα control
- Έντονη μεταβολή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης

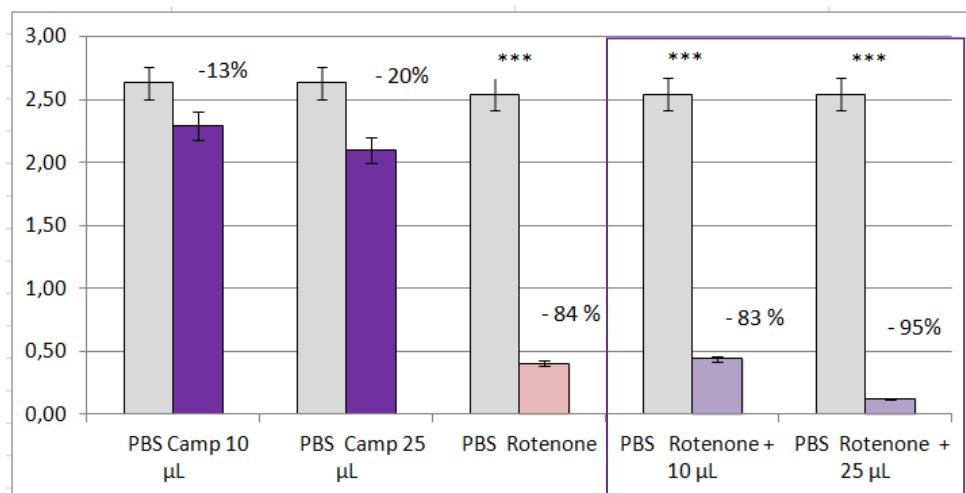
Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67:**

- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση G2 του κυτταρικού κύκλου → Διακοπή κυτταρικού κύκλου
- Εμφανή μειωμένος αριθμός των Ki67⁺ κυττάρων → Αύξηση κυττάρων στην G0 φάση
- Δεν υπάρχουν αποπτωτικοί πυρήνες



Σχήμα 12. Ο αριθμός των θετικών κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχυλίσμα της *Campanula versicolor* σε συνδυασμό με την τοξίνη 6-OHDA.

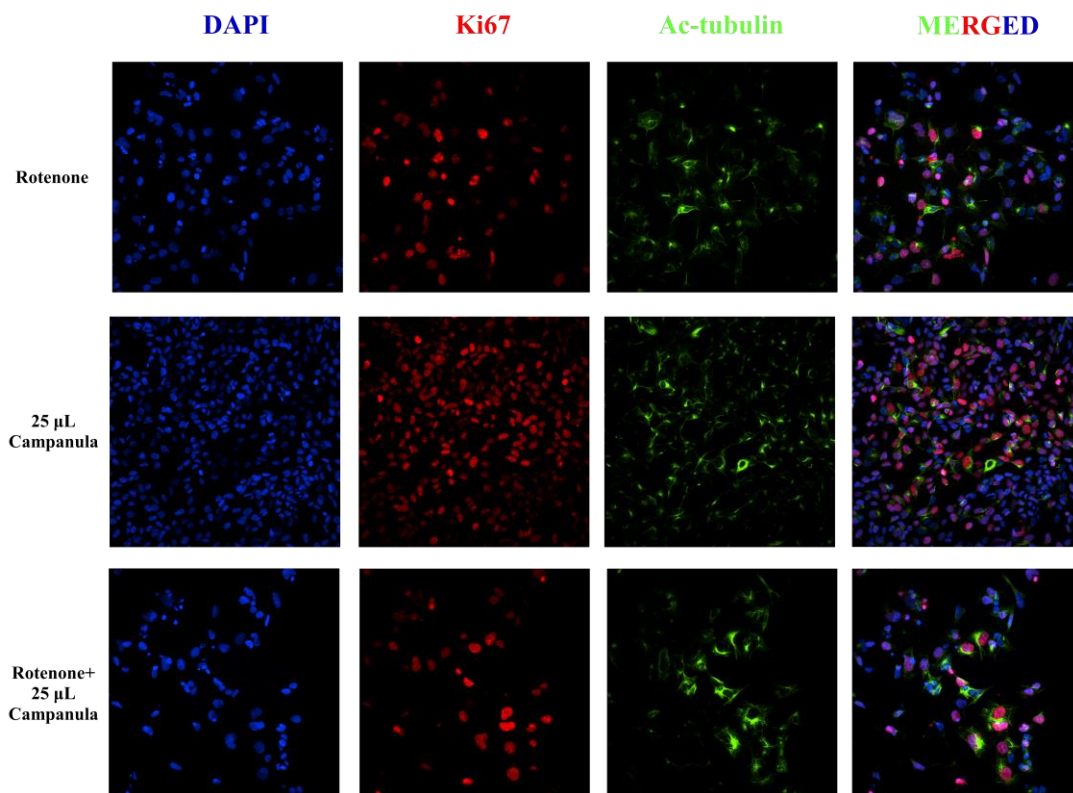
Στη συνθήκη με την τοξίνη Ροτενόνη 1 μM έγινε προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* 10 μL και 25 μL. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε η (1^η) παρατήρηση και στις 48 ώρες από την προσθήκη της τοξίνης και του εκχυλίσματος πραγματοποιείται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.



Σχήμα 13. Χρήση Ροτενόνης στη νευροβλαστωματική σειρά Be2c και προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* για 48 h.

Παρατηρείται μείωση στον αριθμό κυττάρων 10 και 25 μL και η *Campanula versicolor* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (*Rotenone*) στις συγκεντρώσεις 10 και 25 μL .

ICC – Rotenone και *Campanula versicolor* (25 μL)



Εικόνα 53. Διαμόλυνση κυττάρων Be2c που εκτέθηκαν σε συνδυασμό υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor* (25 μL) και Ροτενόνης με αντισώματα κατά **Ki67** και **Ac – tubulin**.

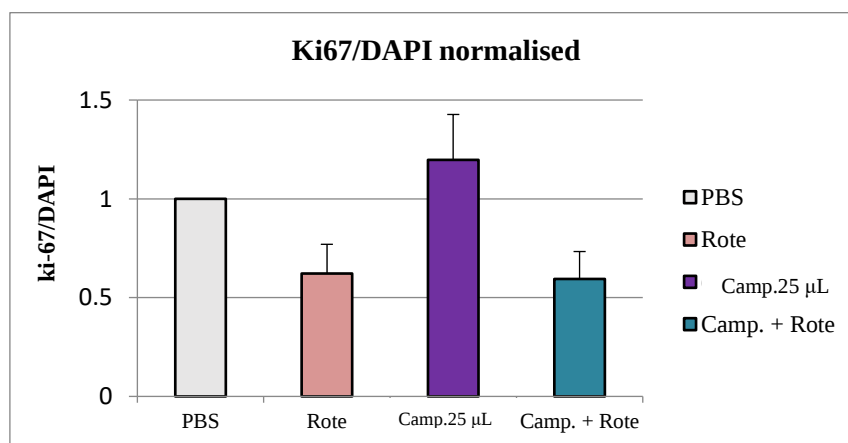
Μετά την επώαση των κυττάρων με τον συνδυασμό **εκχυλίσματος και Ροτενόνη** :

- Εντονότερα στρεσαρισμένα κύτταρα συγκριτικά με τα control
- Απώλεια φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων → Σφαιρικά και μικρά κύτταρα

- Έντονη μεταβολή στην κατανομή και την ένταση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης
- Αύξηση του αριθμού των νεκρωμένων κυττάρων με βάση το DAPI

Παρατηρήσεις αναφορικά με την χρώση **Ki67**:

- Έντονη αύξηση των κυττάρων στην φάση S του κυτταρικού κύκλου → Διακοπή σύνθεσης DNA
- Εμφανά μειωμένος αριθμός των Ki67⁺ κυττάρων → Αύξηση κυττάρων στην G0 φάση
- Αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών πυρήνων



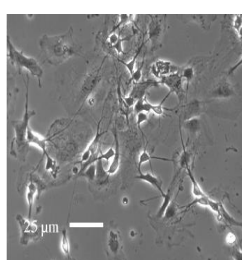
Σχήμα 14. Ο αριθμός κυττάρων Ki67 προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων πυρήνων (DAPI) που εκτέθηκαν στο υδατικό εκχύλισμα της *Campanula versicolor* σε συνδυασμό με την τοξίνη Ροτενόνη.

ΜΕΡΟΣ 3 : Χρήση των τοξινών 6-OHDA και Ροτενόνης ως παραγόντων στρες και μελέτη των επιπτώσεων τους στη κυτταρική σειρά Be2c [RESCUE – Απομάκρυνση (A)]

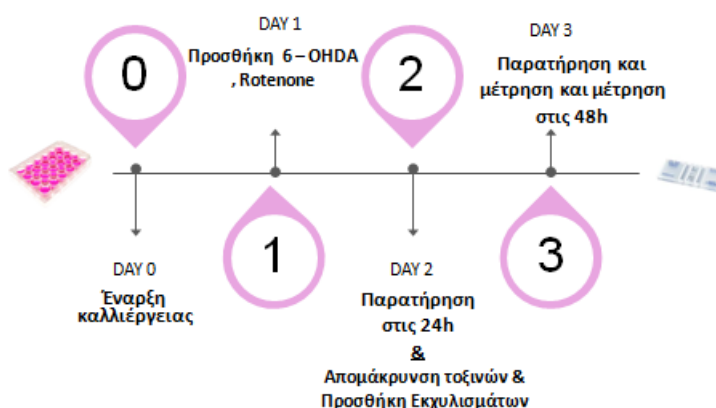
Στο πλαίσιο της εργαστηριακής έρευνας με χρήση 6- OHDA και ροτενόνης, ο όρος "RESCUE" αναφέρεται συνήθως σε πειραματικές παρεμβάσεις ή θεραπείες που στοχεύουν στον μετριασμό ή την αναστροφή των τοξικών επιδράσεων που προκαλούνται από αυτές τις ουσίες σε κυτταρικά μοντέλα. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν παρατηρήσαμε «Rescue» καθώς η προσθήκη υδατικών εκχυλισμάτων μετά την επίδραση 6-OHDA και Rotenone δυσχεραίνει περισσότερο την βιωσιμότητα των κυττάρων.

Η διαδικασία για την προσθήκη των τοξινών 6-OHDA και Rotenone στην κυτταρική σειρά Be2c έγινε με επίστρωση 450.000 κυττάρων/φρεάτιο, μετά από 24 ώρες έγινε η απομάκρυνση των 6- OHDA και Ροτενόνη και έγινε εισαγωγή των υδατικών εκχυλισμάτων *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* στα κύτταρα με σκοπό να εξετάσουμε τον πιθανό μετριασμό των τοξικών επιδράσεων.

Στη συνθήκη με 6-OHDA σε συγκέντρωση 100 μM , πραγματοποιείται μετά απο 24 ώρες η (1^η) παρατήρηση και η αφαίρεση της τοξίνης. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 25 μL του εκχυλίσματος *Lunaria annua*. Μετά το πέρας των 48 ωρών από την προσθήκη του εκχυλίσματος γίνεται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.

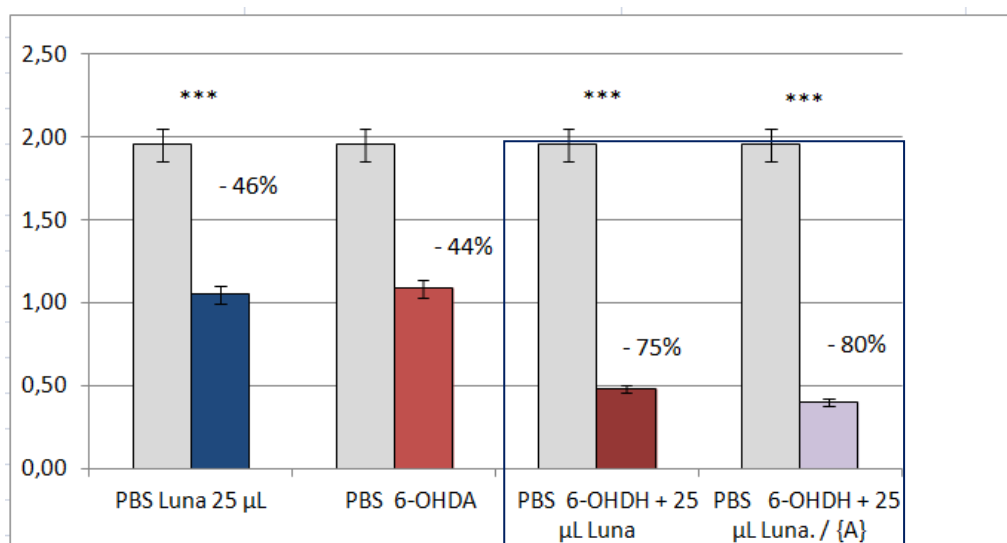


Κυτταρική σειρά Be2c



Εικόνα 54. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος *Lunaria annua* μετά την απομάκρυνση τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.

6- OHDA - *Lunaria annua* 25 μL (A)

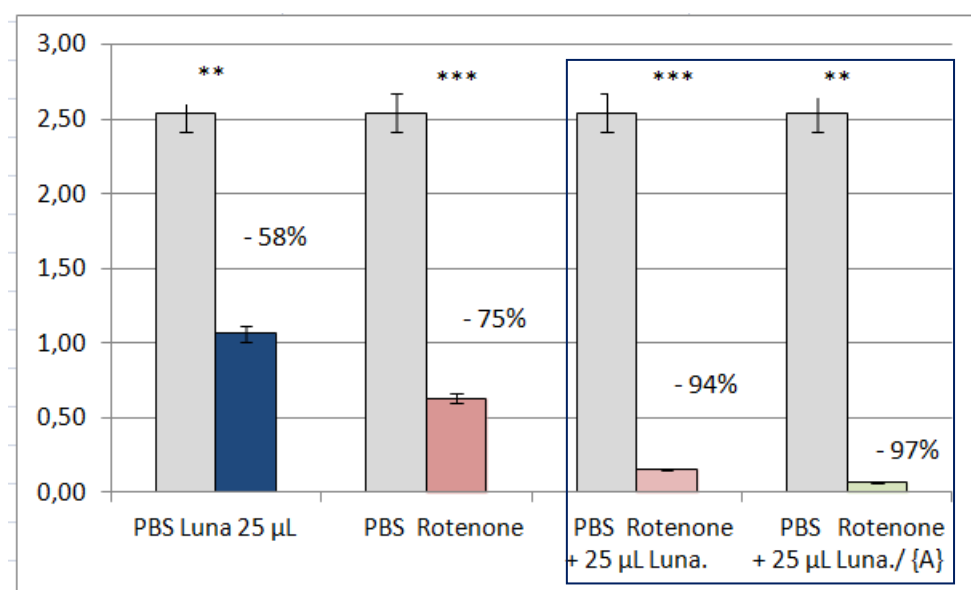


Σχήμα 15. 6 - OHDA και υδατικό εκχύλισμα *Lunaria annua* – Απομάκρυνση {A}

Παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων στα 25 μL υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua*. Παρατηρείται επίσης, πως η *Lunaria annua* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (6- OHDA) και δυσχεραίνει την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την απομάκρυνση της τοξίνης 6 – OHDA.

Ενώ στη συνθήκη με Ροτενόνη σε συγκέντρωση 1 μM , πραγματοποιείται μετά από 24 ώρες η (1^η) παρατήρηση και η απομάκρυνση της τοξίνης. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 25 μL του εκχυλίσματος *Lunaria annua*. Μετά το πέρας των 48 ωρών από την προσθήκη του εκχυλίσματος γίνεται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.

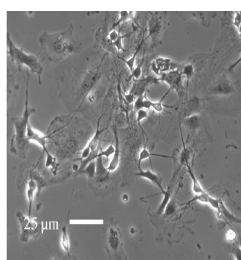
Ροτενόνη - *Lunaria annua* 25 μL (A)



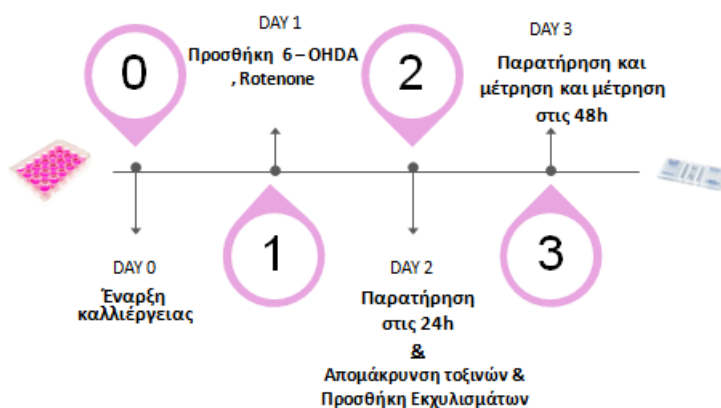
Σχήμα 16. Ροτενόνη και υδατικό εκχύλισμα *Lunaria annua* – Απομάκρυνση {A}

Παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων στα 25 μL υδατικού εκχυλίσματος *Lunaria annua*. Παρατηρείται επίσης , πως η *Lunaria annua* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (Rotenone) και δυσχεραίνει την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την απομάκρυνση της τοξίνης.

Στη συνθήκη με 6-OHDA σε συγκέντρωση 100 μM , πραγματοποιείται μετά από 24 ώρες η (1^η) παρατήρηση και η αφαίρεση της τοξίνης. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 25 μL του εκχυλίσματος *Campanula versicolor*. Μετά το πέρας των 48 ωρών από την προσθήκη του εκχυλίσματος γίνεται η (2^η) παρατήρηση και η (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.

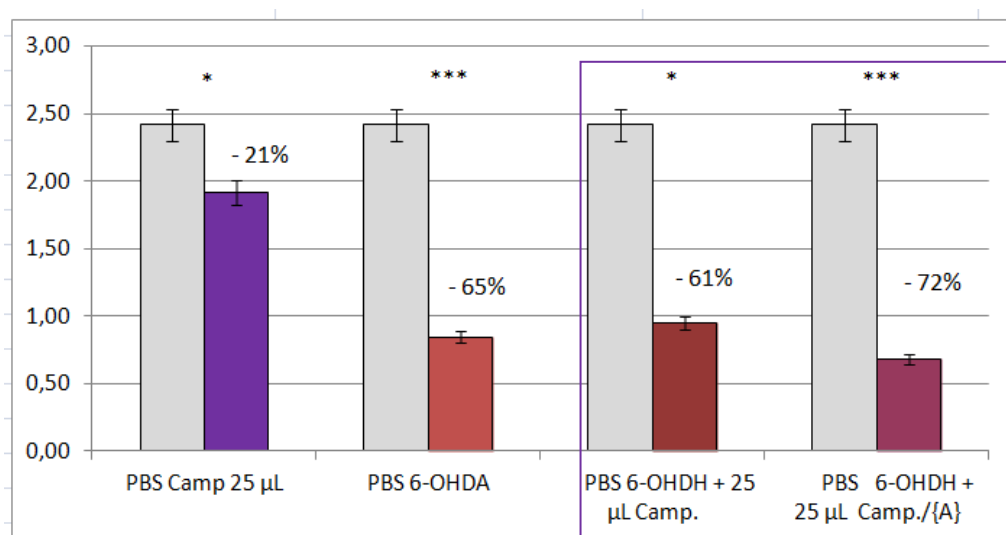


Κυτταρική σειρά Be2c



Εικόνα 55. Σχηματική απεικόνιση της πορείας που ακολουθήθηκε για τη προσθήκη εκχυλίσματος *Campanula versicolor* μετά την απομάκρυνση τοξινών στη κυτταρική σειρά Be2c.

6 – OHDA - *Campanula versicolor* 25 μ L (A)

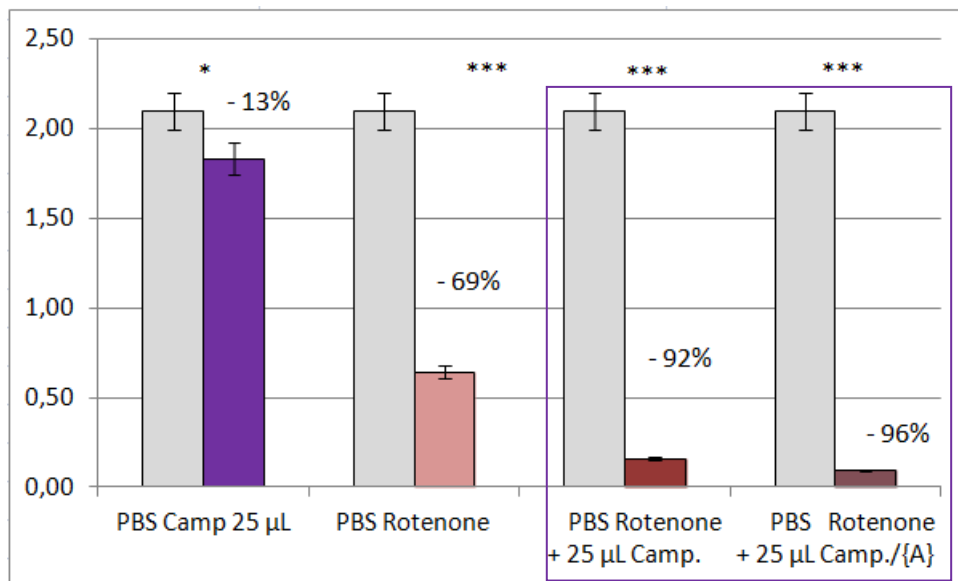


Σχήμα 17. 6- OHDA και υδατικό εκχύλισμα *Campanula versicolor* – Απομάκρυνση {A}

Παρατηρείται μείωση στον αριθμό κυττάρων στα 25 μ L υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor*. Παρατηρείται επίσης, πως η *Campanula versicolor* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (6-OHDA) και δυσχεραίνει την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την απομάκρυνση της τοξίνης 6-OHDA.

Στη συνθήκη με Ροτενόνη σε συγκέντρωση 1 μ M, πραγματοποιείται μετά από 24 ώρες η (1^η) παρατήρηση και η αφαίρεση της τοξίνης. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη 25 μ L του εκχυλίσματος *Campanula versicolor*. Μετά το πέρας των 48 ωρών από την προσθήκη του εκχυλίσματος γίνεται η (2^η) παρατήρηση και (1^η) μέτρηση των κυττάρων Be2c.

Ροτενόνη - *Campanula versicolor* 25 μ L (A)

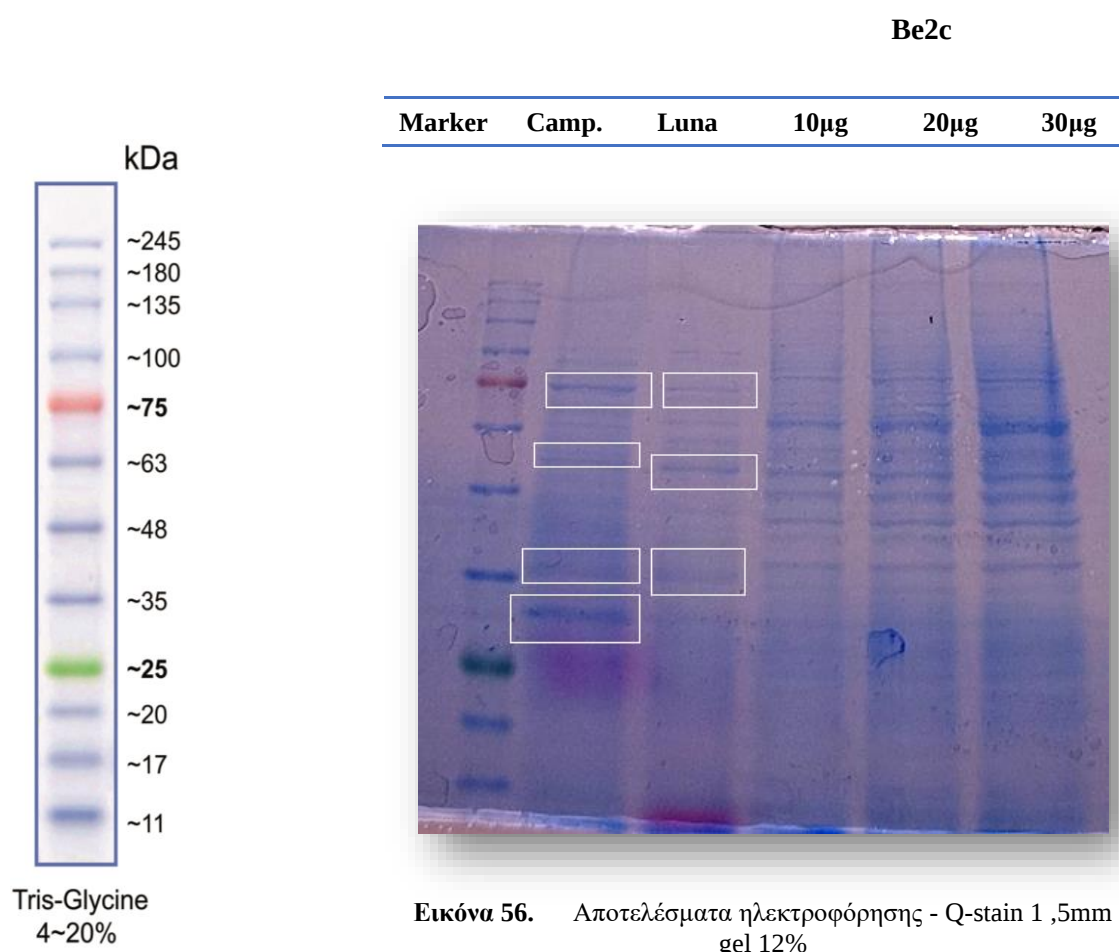


Σχήμα 18. Ροτενόνη και υδατικό εκχύλισμα *Campanula versicolor* – Απομάκρυνση {A}

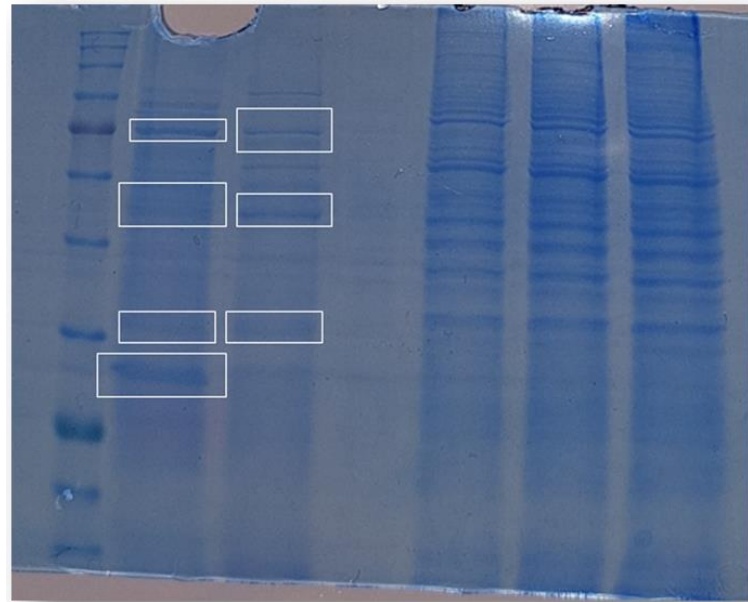
Παρατηρείται μείωση στον αριθμό κυττάρων στα 25 μ l υδατικού εκχυλίσματος *Campanula versicolor*. Παρατηρείται επίσης, πως η *Campanula versicolor* έχει συνεργατική δράση με τα φάρμακα (Rotenone) και δυσχεραίνει την βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την απομάκρυνση της τοξίνης.

ΜΕΡΟΣ 4: Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή πολυακρυλαμιδίου με SDS

Για τον προσδιορισμό της φύσεως των παραγόντων που βρίσκονται στα εκχυλίσματα των φυτών και επηρεάζουν την βιολογία των κυττάρων πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση με την μέθοδο Bradford και τη μέθοδος πηκτώματος ακρυλαμίδης με τα εκχυλίσματα των φυτών *Lunaria annua*, και *Campanula versicolor*, στα υδατικά διαλύματα.



Marker	Camp	Luna	10μg	20μg	30μg
--------	------	------	------	------	------



Παρατηρήθηκε πως στα φυτικά εκχυλίσματα της *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* υπάρχουν πρωτεϊνικά συστατικά. Συγκεκριμένα, από το υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος της *Campanula versicolor* προκύπτουν αποτελέσματα ζωνών περίπου στα 100 kDa, 90kDa, 75kDa, 64 kDa, 55 kDa, 35 kDa και 30 kDa. Ενώ για το υδατικό εκχύλισμα της *Lunaria annua* προκύπτουν αποτελέσματα ζωνών στα 100 kDa, 75kDa, 64 kDa, 55 kDa, 35 kDa.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φαρμακευτικά φυτά περιέχουν ενεργά στοιχεία που μπορούν να έχουν προληπτικές ή θεραπευτικές ιδιότητες έναντι ασθενειών. Η παραδοσιακή ιατρική, η οποία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση φαρμακευτικών φυτών, υπήρξε σημαντικό μέρος της ανθρώπινης ιστορίας, με την προέλευσή της να χρονολογείται από τους αρχαίους πολιτισμούς. Η εξερεύνηση των φαρμακευτικών φυτών και των δραστικών ουσιών τους έχει προχωρήσει περαιτέρω μέσω της επιστήμης της εξαγωγής φυτών.

Τα άνθη χρησιμεύουν ως αναπαραγωγικά όργανα των φυτών και συχνά παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων. Αυτά τα ζωντανά χρώματα αποδίδονται κυρίως σε χρωστικές ουσίες που υπάρχουν στα πέταλα των ανθέων. Οι χρωστικές ουσίες, όπως οι ανθοκυανίνες, όχι μόνο προστατεύουν το φυτό αλλά παίζουν επίσης ουσιαστικούς ρόλους σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες.

Οι ανθοκυανίνες είναι μια κατηγορία χρωστικών που είναι υπεύθυνες για τα κόκκινα, μοβ και μπλε χρώματα που παρατηρούνται σε πολλά άνθη. Ανήκουν σε μια μεγαλύτερη ομάδα ενώσεων γνωστή ως φλαβονοειδή, οι οποίες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές και συντίθενται σε εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται χρωμοπλάστες.

Εκτός από την οπτική τους έλξη, οι ανθοκυανίνες έχουν βρεθεί ότι έχουν πιθανά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να καθαρίσουν τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες, να μειώσουν το οξειδωτικό στρες και να αναστείλουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες στο σώμα. Ως αποτέλεσμα, οι ανθοκυανίνες έχουν συσχετιστεί με διάφορες επιδράσεις που προάγουν την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της καρδιαγγειακής προστασίας, της αντικαρκινικής δραστηριότητας και της ενισχυμένης γνωστικής λειτουργίας.

Σκοπός της αναφερόμενης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων από *Campanula versicolor* και *Lunaria annua* σε κύτταρα νευροβλαστώματος της κυτταρικής σειράς Be2c. Η μελέτη είχε ως στόχο να καθορίσει εάν αυτά τα φυτικά εκχυλίσματα είχαν συνεργατικό ή ανταγωνιστικό ρόλο σε κυτταροκαλλιέργειες που εκτέθηκαν σε νευροτοξίνες, όπως η 6-OHDA και η Ροτενόνη, οι οποίες εισήχθησαν ως πρόσθετοι παράγοντες στρες.

Η προσθήκη των υδατικών εκχυλισμάτων *Lunaria annua* και *Campanula versicolor* στη κυτταρική σειρά Be2c, για 48 ώρες, έδειξε πως ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα (control - PBS) τους.

Για την διερεύνηση του πιθανού προστατευτικού ρόλου των εκχυλισμάτων σε νευροβλαστωματικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς Be2c, έγινε προσθήκη υδατικών εκχυλισμάτων από τα φυτά *Campanula versicolor* και *Lunaria annua* σε συνδυασμό προσθήκης τοξινών 6-OHDA και Ροτενόνη για 48 ώρες αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε,

πως και τα δύο υδατικά διαλύματα από τα εκχυλίσματα των φυτών, έχουν συνεργατική δράση με τις νευροτοξίνες και μειώνουν δραματικά τον αριθμό των κυττάρων, τόσο σε σύγκριση με τις τοξίνες αλλά και με το μάρτυρα (control - PBS) τους. Με μεγαλύτερη μείωση στον αριθμό των κυττάρων, το υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος της *Lunaria annua*.

Ακόμη, προσθέσαμε τις τοξίνες που προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ύστερα από 24 h απομακρύνουμε τις τοξίνες και προσθέσαμε τα εκχυλίσματα για να δούμε αν έχουν προστατευτική ή ανταγωνιστική δράση. Παρατηρήθηκε, ότι και τα δυο (2) υδατικά διαλύματα από τα εκχυλίσματα των φυτών, έχουν συνεργατική δράση με τις νευροτοξίνες και δυσχεραίνουν τον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των νευρικών καρκινικών κυττάρων.

Επίσης, μελετήσαμε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την δυναμική των μικροσωληνίσκων, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα κατά Ki67, μιας πρωτεΐνης-δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων, και την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη, αντίστοιχα, που είναι δείκτης για τη μελέτη της δυναμικής των μικροσωληνίσκων.

Για τον προσδιορισμό της φύσεως των παραγόντων που βρίσκονται στα εκχυλίσματα των φυτών και επηρεάζουν τη βιολογία των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου, όπου παρατηρήθηκε ότι το υδατικό διάλυμα του εκχυλίσματος πετάλων του φυτού *Lunaria annua* και το υδατικό διάλυμα του εκχυλίσματος πετάλων του φυτού *Campanula versicolor* εμφανίζουν πρωτεΐνες στα 100 kDa, 75 kDa, 64 kDa, 55 kDa, 35 kDa και 100 kDa, 90 kDa, 75 kDa, 64 kDa, 55 kDa, 35 kDa και 30 kDa αντίστοιχα.

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν πως η επίδραση των εκχυλισμάτων από τα πέταλα των φυτών *Campanula versicolor* και *Lunaria annua* μειώνουν την ανάπτυξη των κυττάρων του νευρικού συστήματος και αυξάνουν το μιτοχονδριακό στρες καθώς έχουν συνεργατική δράση με τις νευροτοξίνες. Ενθαρρύνουν δε επιπλέον μελέτες προκειμένου να προσδιορισθούν τα ενεργά συστατικά που περιέχονται σε αυτά τα εκχυλίσματα αλλά και τον συνδυασμό αυτών με άλλα φάρμακα για την καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
- Alegre-Cortés, E., Muriel-González, A., Canales-Cortés, S., Uribe-Carretero, E., Martínez-Chacón, G., Aiastui, A., ... & Yakhine-Diop, S. M. (2020). Toxicity of necrostatin-1 in Parkinson's disease models. *Antioxidants*, 9(6), 524.
- Abedi-Firoozjah, R., Yousefi, S., Heydari, M., Seyedfatehi, F., Jafarzadeh, S., Mohammadi, R., ... & Garavand, F. (2022). Application of red cabbage anthocyanins as pH-sensitive pigments in smart food packaging and sensors. *Polymers*, 14(8), 1629.
- Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., & Lima, G. P. P. (2017). Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. *Medicinal plants and environmental challenges*, 259-277.
- Chaves, J. O., De Souza, M. C., Da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. D. F., ... & Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in Chemistry*, 8, 507887.
- Denkert, C., Budczies, J., von Minckwitz, G., Wienert, S., Loibl, S., & Klauschen, F. (2015). Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *The Breast*, 24, S67-S72.
- Dewick, P. M. (2017). Isoflavonoids. In *The flavonoids* (pp. 117-238). Routledge.
- DEVEOĞLU, O., & KARADAĞ, R. (2019). A review on the flavonoids—a dye source. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 31(3), 188-200.
- Elkanzi, N. A., Hrichi, H., Alolayan, R. A., Derafa, W., Zahou, F. M., & Bakr, R. B. (2022). Synthesis of chalcones derivatives and their biological activities: a review. *ACS omega*, 7(32), 27769-27786.
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967.
- Glover BJ. 2014. Understanding Flowers and Flowering, B.J. Glover ed., Oxford University Press, New York.

- Guidetti, G., Sun, H., Marelli, B., & Omenetto, F. G. (2020). Photonic paper: Multiscale assembly of reflective cellulose sheets in *Lunaria annua*. *Science Advances*, 6(27), eaba8966
- He, X., Yang, F., & Huang, X. A. (2021). Proceedings of chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and synthesis of biflavonoids. *Molecules*, 26(19), 6088.
- Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5(2), 27.
- Lin, B. W., Gong, C. C., Song, H. F., & Cui, Y. Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1226-1243.
- Janković, I. B., Drobac, M. M., & Lakušić, D. V. (2014). Compounds of the methanolic leaf extract as chemotaxonomic markers for the *Campanula pyramidalis* complex (Campanulaceae). *Acta Botanica Croatica*, 73(2), 481-490.
- Jucá, Mércia Marques, et al. "Flavonoids: biological activities and therapeutic potential." *Natural product research* 34.5 (2020): 692-705.
- Johnsen, J. I., Dyberg, C., & Wickström, M. (2019). Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 9.
- Katanić Stanković, J. S., Nikles, S., Pan, S. P., Matić, S., Sreckovic, N., Mihailovic, V., & Bauer, R. (2022). The qualitative composition and comparative biological potential of *Lunaria annua* L.(Brassicaceae) extracts. *Kragujevac Journal of Science*.
- Kaji, H., Matsui-Yuasa, I., Matsumoto, K., Omura, A., Kiyomoto, K., & Kojima-Yuasa, A. (2020). Sesaminol prevents Parkinson's disease by activating the Nrf2-ARE signaling pathway. *Heliyon*, 6(11), e05342.
- Kallam, K., Appelhagen, I., Luo, J., Albert, N., Zhang, H., Deroles, S., ... & Martin, C. (2017). Aromatic decoration determines the formation of anthocyanic vacuolar inclusions. *Current Biology*, 27(7), 945-957.
- Kothari, D., Lee, W. D., & Kim, S. K. (2020). Allium flavonols: Health benefits, molecular targets, and bioavailability. *Antioxidants*, 9(9), 888.
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Duchnik, E., & Marchlewicz, M. (2022). Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 72(1), 1-24.
- Liu, Y., Liu, Y., Tao, C., Liu, M., Pan, Y., & Lv, Z. (2018). Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1744-1753.

- Łubek-Nguyen, A., Ziemichód, W., & Olech, M. (2022). Application of enzyme-assisted extraction for the recovery of natural bioactive compounds for nutraceutical and pharmaceutical applications. *Applied Sciences*, 12(7), 3232.
- Lawana, V., & Cannon, J. R. (2020). Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. In *Advances in neurotoxicology* (Vol. 4, pp. 209-254). Academic Press.
- Máthé, Á., Hassan, F., & Kader, A. A. (2015). Medicinal and aromatic plants of the world. *Medicinal and Aromatic Plants World*.
- Mazziotti, I., Petrarolo, G., & La Motta, C. (2022). Aurones: A golden resource for active compounds. *Molecules*, 27(1), 2.
- Mercatelli, D., Balboni, N., Palma, A., Aleo, E., Sanna, P. P., Perini, G., & Giorgi, F. M. (2021). Single-cell gene network analysis and transcriptional landscape of MYCN-amplified neuroblastoma cell lines. *Biomolecules*, 11(2), 177.
- Milena, V., Tatjana, M., Gökhan, Z., Ivana, B., Aleksandra, C., Mohammad, M. F., & Marija, R. (2019). Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers. *Industrial Crops and Products*, 136, 93-101.
- Nistor, M., Pop, R., Daescu, A., Pinte, A., Socaciu, C., & Rugina, D. (2022). Anthocyanins as Key Phytochemicals Acting for the Prevention of Metabolic Diseases: An Overview. *Molecules*, 27(13), 4254.
- Ng J and Smith SD. 2016. How to make a red flower: the combinational effect of pigments. *AoB Plants*, 8: doi: 10.1093/aobpla/plw013.
- Nekooki-Machida, Y., & Hagiwara, H. (2020). Role of tubulin acetylation in cellular functions and diseases. *Medical molecular morphology*, 53(4), 191-197.
- Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 4299-4315.
- Pinto, M. M., Palmeira, A., Fernandes, C., Resende, D. I., Sousa, E., Cidade, H., ... & Cravo, S. (2021). From natural products to new synthetic small molecules: A journey through the world of xanthenes. *Molecules*, 26(2), 431.
- Perlberg, V., Lambert, J., Butler, B., Felfli, M., Valabrègue, R., Privat, A. L., ... & Petiet, A. (2018). Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI. *PLoS One*, 13(9), e0202597.

Qi, J. (2018). Development of an Analytical Method for Quantification of Endocrine-Disrupting Phytoestrogenic Compounds in Estuarine Environment Using UHPLC-MS/MS.

Salehi, B., Quispe, C., Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., Sharifi-Rad, J., ... & Les, F. (2021). Pharmacological properties of chalcones: a review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 592654.

Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., ... & Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants*, 11(22), 3158.

Stevens, Y., Rymenant, E. V., Grootaert, C., Camp, J. V., Possemiers, S., Masclee, A., & Jonkers, D. (2019). The intestinal fate of citrus flavanones and their effects on gastrointestinal health. *Nutrients*, 11(7), 1464.

Yoshida K, Mori M and Kondo T. 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Products Reports*, 26 (7): 857-964

Zhang, Y., Butelli, E., & Martin, C. (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current opinion in plant biology*, 19, 81-90.

Αρτέμιος Μποζαμπαλίδης, 2015. Βοτανική - Μορφολογία και Ανατομία Φυτών. University Studio Press. ISBN 978-960-12-2208-0

Γούσιας. Γ. (2017). Μελέτη μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από αρωματικά φυτά. (Διπλωματική εργασία). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή χημικών μηχανικών τομέας iv: σύνθεσης και ανάπτυξης βιομηχανικών διαδικασιών Εργαστήριο χημείας και τεχνολογίας τροφίμων.

Κουτροπούλου. Ν.Κ. (2018). Εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας φλαβονοειδών με τη χρήση αντίστροφου φάσεως χρωματογραφία: αξιολόγηση της στατικής φάσης “discovery rp amide c16”. Αθήνα : Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο. Σχολή θετικών επιστημών τμήμα φαρμακευτικής. Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών "φαρμακευτική ανάλυση – έλεγχος ποιότητας"

Μαγούλα. Μ. (2020). Η Επίδραση Εκχυλισμάτων από Αντιπροσωπευτικά Φυτά των Οικογενειών Campanulaceae, Brassicaceae και Ranunculaceae σε Νευρικά Κύτταρα και σε Ινοβλάστες Ποντικίου. (Μεταπτυχιακή διατριβή). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Ράγγα. Ζ. , (2014) Καταγραφή της *Campanula versicolor* στην Ήπειρο.(Πτυχιακή εργασία). Άρτα : ΤΕΙ Ηπείρου.

Χαλκίδης. Δ. (2019). Μελέτη οπτικών ιδιοτήτων χαρακτηριστικών ανθικών ιστών. (Διπλωματική εργασία). Αθήνα : Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο.