



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Βιολογικές δράσεις αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών

Παρασκευή Υφαντή

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2014

« Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα
Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 735/06-03-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Μαρία-Ελένη Λέκκα Καθηγήτρια, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης Καθηγητής, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μάνος Γεώργιος Καθηγητής, τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Ημερομηνία ορισμού θέματος: Γ.Σ.Ε.Σ.: 735/06-03-2009

Θέμα: «Βιολογικές δράσεις αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 947/09-12-14

Μαρία-Ελένη Λέκκα Καθηγήτρια, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης Καθηγητής, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεώργιος Μάνος Καθηγητής, τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Άννα Μπατιστάτου Καθηγήτρια, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννης Κωνσταντίνου Αναπληρωτής καθηγητής, τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστημίου Πατρών

Γεώργιος Πατακιούτας Αναπληρωτής καθηγητής, τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Ελένη Λενέτη Αναπληρώτρια καθηγήτρια, τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 22-01-2014

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λέκκα Μαρία – Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ελένη Αδαμαντίου

Αφιερώνεται στο γιό μου Στάθη

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν συγκεκριμένες βιολογικές δράσεις (αντικαρκινική, φυτοπροστατευτική) ορισμένων αρωματικών – φαρμακευτικών φυτών που επιλέχθηκαν από την αυτοφυή χλωρίδα της Ηπείρου. Για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών εφαρμόστηκε η μέθοδος της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων. Τα πτητικά συστατικά (αιθέριο έλαιο) των αρωματικών φυτών παραλήφθηκαν με τη μέθοδο της υδρο-απόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger.

Αρχικά διερευνήθηκε η πιθανή αντικαρκινική δράση των επιλεγμένων φυτικών ειδών στην A549 καρκινική κυτταρική σειρά, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο. Ο τύπος του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση – νέκρωση) μελετήθηκε με βιοχημικά και μορφολογικά κριτήρια. Τα εκχυλίσματα που παρουσίασαν ενδιαφέρον για την αντικαρκινική τους δράση αξιολογήθηκαν. Εκείνα που επιλέχθηκαν μελετήθηκαν για την εκλεκτικότητα της δράσης τους, έπειτα από επίδρασή τους σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Ένα από τα αρωματικά φυτά που παρουσίασε ενδιαφέρον για την αποπτωτική του δράση στα A549 καρκινικά κύτταρα, αναλύθηκε χρωματογραφικά (GC-MS, DHS-GC-MS) και μελετήθηκε για την αντιμυκητική του δράση σε τρία φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων που προσβάλουν την τομάτα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την αντικαρκινική του δράση παρουσίασε το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων του φαρμακευτικού φυτού *H. cyclophyllus*, το οποίο, όπως διαπιστώθηκε επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα (πνευμονικούς ινοβλάστες). Το εκχύλισμα φύλλων του *H. cyclophyllus* διαπιστώθηκε, ότι προκαλεί εξωκυττάρωση και σχηματισμό κυστιδίων (ectosomes), αποκόλληση των A549 καρκινικών κυττάρων από το υπόστρωμά τους, σχηματισμό ενός μεγάλου σε μέγεθος κυστιδίου εντός του κυτταροπλάσματος που μοιάζει με δομές γνωστές ως θανατοσώματα και τέλος επάγει την απόπτωσή τους. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστή κάποια ουσία που να προκαλεί τα προαναφερόμενα φαινόμενα και να οδηγεί σε επιλεκτική απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Τα μειωμένα επίπεδα της προκάσπασης -3 και η διάσπαση της PARP ($0.1, 0.6 \text{ mg mL}^{-1}$) που διαπιστώθηκαν με ανοσοαπώτωση κατά Western blot επιβεβαιώνουν την αποπτωτική δράση του εκχυλίσματος.

Από τα αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae που δοκιμάστηκαν για την βιοδραστικότητά τους σε A549 καρκινικά κύτταρα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το είδος *S. horvatii* ssp.

macrophylla. Το είδος αυτό, το οποίο ανήκει στην ομάδα του *S. montana*, είναι ενδημικό της χώρας μας και αυτοφύεται στις βορειοδυτικές περιοχές της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές ενεργοποιεί την απόπτωση και προκαλεί νέκρωση στα A549 επιθήλια καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Ο μορφολογικός έλεγχος των κυττάρων, έπειτα από χρώση ηωσίνης – αιματοξυλίνης και DAPI επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής. Κατά την παρατήρηση των κυττάρων διαπιστώθηκαν, τόσο αποπτωτικά χαρακτηριστικά, όπως πύκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος, σχηματισμός μικροπυρήνων και αποπτωτικών σωμάτων, όσο και νεκρωτικά χαρακτηριστικά, όπως συμπυκνώματα χρωματίνης και διόγκωση των κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο της επίδρασης. Η αποπτωτική δράση του εκχυλίσματος επιβεβαιώθηκε και από τα μειωμένα επίπεδα της προκαψάσης -3 που διαπιστώθηκαν 24 ώρες μετά την επίδραση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος (10, 20 mg mL⁻¹).

Όπως διαπιστώθηκε από την αέριο χρωματογραφική ανάλυση του αιθέριου ελαίου (GC-MS) το *S. horvatii* ssp. *macrophylla* που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές ανήκει στον χημειότυπο της καρβακρόλης (42-48%). Στο αιθέριο έλαιο ταυτοποιήθηκαν 48 συστατικά από τα οποία τα 22 αναφέρονται για πρώτη φορά ως συστατικά του αρωματικού αυτού φυτού. Τα συστατικά του αιθέριου ελαίου που περιέχονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 0.1 % ανιχνεύονται (GC-MS) στο μεθανολικό εκχύλισμα. Παρόλα αυτά ένα μικρό μέρος αυτών (3,41%) περιέχεται στο υδατικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος που εφαρμόστηκε στα κύτταρα (GC-MS).

Η αντιμυκητική δράση του επιλεγμένου αρωματικού φυτού μελετήθηκε για τα είδη *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* που προκαλούν, εκτός από προσβολές των φυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, μετασυσπλεκτικές σήψεις στους καρπούς της τομάτας και το είδος *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, το οποίο είναι εδαφογενές φυτοπαθογόνο που προκαλεί αδρομύκωση στα φυτά της τομάτας.

Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών στα 3 φυτοπαθογόνα είδη διαπιστώθηκε, ότι το αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* ήταν ιδιαίτερα δραστικό σε αντίθεση με το υδατικό κλάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος. Για όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν η δράση του αιθέριου ελαίου ήταν μυκοστατική, ενώ μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η υποκαπνιστική δράση του αιθέριου ελαίου συγκριτικά με την δράση εξ' επαφής. Η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξη (MIC) υπολογίστηκε σε 123 μL L⁻¹ αέρα για το *F. oxysporum* f.

sp. lycopersici και σε 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το *A. alternata*. Παρόλα αυτά η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC 50) υπολογίστηκε σε 1.02 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, σε 2.62 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το είδος *A. alternata* (7^η μέρα) και 2.17 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το *B. cinerea* (6^η μέρα), κάτι που οφείλεται στον διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης των μυκήτων.

Abstract

In the present thesis we studied specific biological effects (anticancer, plant protectant) of some aromatic and medicinal plants that were chosen from the wild grown flora in the region of Epirus. The bioactive components were extracted by sonication. The volatile components (essential oil) of the aromatic plants was obtained by hydro-distillation using a Clevenger type apparatus.

At first the possible anticancer activity of the selected plant species was investigated on cancer cell line A549 that was used as a model. The type of cell death (apoptosis - necrosis) was investigated by biochemical and morphological criteria. The extracts that showed anticancer activity were evaluated. The selected extracts were studied for their selectivity after influence on lung fibroblasts. One of the aromatic plants that showed interest for its apoptotic activity on cancer cells A549, was analyzed chromatographically (GC-MS, DHS-GC-MS) and studied for its antifungal activity on three phytopathogenic fungi which infect tomatoes or tomato plants.

Particular interest for its anticancer activity showed the methanol extract of *H. cyclophyllus* leaves which is a medicinal plant that induces apoptosis on cancer cells A549 while it doesn't affect normal cells of lung (lung fibroblasts).

The extract of *H. cyclophyllus* leaves was found to cause exocytosis and vesicle formation (ectosomes), detachment of cancer cells A549 from their substrate, formation of a large vesicle into the cytoplasm like structures known as thanatosomata and finally induction of apoptosis. Until today there is not known a substance which causes the above phenomena and leads to selective apoptosis of cancer cells. The reduced levels of prokaspase -3 and the cleavage of PARP ($0.1, 0.6 \text{ mg mL}^{-1}$) that was found by Western blot confirms the apoptotic activity of the extract.

From the aromatic plants of Lamiaceae family that were tested for their bioactivity on cancer cells A549 particular interest showed the species *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. This species, that belongs to *S. montana* aggregate, is an endemic plant grown wild in the northwestern areas of our country. According to the results of flow cytometry the extract that was used in bioassays induces apoptosis and causes necrosis on epithelial lung cancer cells A549. Morphological evaluation of cells stained eosin-haematoxylin and DAPI stain confirms the results of flow cytometry. During the observation of the cells it has been observed apoptotic characteristics, like nuclear and cytoplasmic condensation, formation of micronuclei and apoptotic bodies and necrotic characteristics like oncosis, vacuolization

and chromatin clumping. The reduced levels of procaspase-3 that observed by immunoblotting, at treated cells, after 24 hours exposure, confirms the pro-apoptotic effect of *S. horvatii* ssp. *macrophylla* extract, towards cancer cells A549.

As it has been found by gas chromatographic analysis the essential oil (GC-MS) of *S. horvatii* ssp. *macrophylla* that was used for the bioassays belongs to the carvacrol chemotype (42-48%). In the essential oil were identified 48 components (GC-MS) from which 22 were mentioned for first time as components of this aromatic plant. The constituents that contained in more than 0.1% in the essential oil (GC-MS) were detected in methanol extract. Nevertheless a small part them (3.41%) contained in the aqueous fraction of the methanolic extract that was applied to the cells (GC-MS).

The antifungal activity of the selected aromatic plant was studied against *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* which are phytopathogenic fungi that infect plants during their growth, cause post harvest diseases on tomatoes and on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, which is a soil-borne phytopathogenic fungi which causes tomato wilt.

The results showed that for all the phytopathogenic fungi tested, the essential oil of *S. horvatii* ssp. *macrophylla* was highly effective in contrast to the aqueous fraction of the dried methanolic extract. The action of the essential oil was fungistatic for all the tested concentrations. Of the greatest interest was the fumigant action compared to the contact action.

The minimum inhibitory concentration of mycelium growth (MIC) was $123 \mu\text{L L}^{-1}$ air for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and $100 \mu\text{L L}^{-1}$ for *A. alternata*. Nevertheless, the EC 50 value was calculated at $1.02 \mu\text{L L}^{-1}$ for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, at $2.62 \mu\text{L L}^{-1}$ for *A. alternata* (after 7 days) and $2.17 \mu\text{L L}^{-1}$ for *B. cinerea* (after 6 days), due to the different rate of fungi growth.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της προσπάθειάς μου αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής και όχι μόνο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κυρία Μαρία-Ελένη Λέκκα Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κύρια επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα της συνεργασίας μας. Η θετικής της στάση, η ενθάρρυνση, οι συμβουλές και η καθοδήγησή της με ενέπνευσαν και με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τόσο τα μέλη της τριμελούς, όσο και της επταμελούς επιτροπής που με τίμησαν με τη συμμετοχή και τη συμβολή τους, με υποστήριξαν και έδειξαν ενδιαφέρον στην προσπάθειά μου αυτή. Ιδιαίτερος τους ευχαριστώ, γιατί μέσα σε ένα πνεύμα ελευθερίας της πανεπιστημιακής έρευνας συνέβαλαν εποικοδομητικά στην ευδοκίμηση αυτής της προσπάθειας.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κύριο Γεώργιο Μάνο καθηγητή του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Ηπείρου, για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, την επιστημονική και ηθική του υποστήριξη, τις υποδείξεις του και τη συμπαράστασή του, όχι μόνο κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής αλλά και καθόλη την πορεία μου, από τις προπτυχιακές μου σπουδές έως σήμερα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Τριαντάφυλλο Αλμπάνη καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, τις συμβουλές και την υποστήριξη που μου παρείχε στο αναλυτικό μέρος, τόσο στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όσο και στο παρελθόν.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κυρία Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθειά της σε τεχνικά θέματα που αφορούν τη χρώση των κυττάρων, τον έλεγχο της μορφολογίας τους, αλλά και για τη συμμετοχή της στην επταμελή επιτροπή. Με τη στάση της και τις εύστοχες παρατηρήσεις της με ενθάρρυνε στη συνέχιση και την ολοκλήρωση της προσπάθειας μου αυτής.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Ιωάννη Κωνσταντίνου, Αναπληρωτή Καθηγητή, του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, του Πανεπιστημίου Πατρών για τις εύστοχες υποδείξεις του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Γεώργιο Πατακιούτα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Ηπείρου, για τη συμμετοχή του στην επταμελή επιτροπή, τη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, τη διάθεση εργαστηριακού εξοπλισμού, τις ουσιαστικές υποδείξεις και διορθώσεις στο φυτοπροστατευτικό μέρος αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την κυρία Ελένη Λενέτη Αναπληρώτρια καθηγήτρια του Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων του ΤΕΙ Ηπείρου για το προσωπικό της ενδιαφέρον, την υποστήριξή της καθώς και για τον ορθογραφικό και συντακτικό έλεγχο της διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Παναγιώτη Κούκλη επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που μου επέτρεψε την πρόσβαση και τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού καθώς και για τη χορήγηση αναλωσίμων που αφορούν τη χρώση DAPI.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την κυρία Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και την Δρ. Ζωή Καρέτσου ΕΔΙΠ για τη χορήγηση αντισωμάτων καθώς και για τις σημαντικές τους υποδείξεις.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Δημήτριο Κλέτσα διευθυντή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Εφαρμογών Δημόκριτος για τη διάθεση των πνευμονικών ινοβλαστών.

Σημαντική ήταν επίσης η βοήθεια της Δρ. Όλγας Κωστούλα για τις τεχνικές απομόνωσης μυκήτων και τη μέθοδο της διάχυσης σε στερεό μέσο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο Δρ. Ευάθιο Βασδέκη, τους MSc Ιωάννη Γιαννακόπουλο και Μιχάλη Καραγιανόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν στο ξεκίνημα αυτής της διατριβής και την καλή μας συνεργασία στη συνέχεια. Ευχαριστώ επίσης τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ελευθερία Καζεπίδου και Γλυκερία Βελιβάση καθώς και την υποψήφια διδάκτορα και συμφοιτήτρια κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών MSc Μαρία Κολιού για τη πολύτιμη βοήθειά τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου

βιοχημείας για την επικοινωνιακή συνεργασία μας όλο αυτό το διάστημα, καθώς και τον φίλο και συνάδερφο MSc Κωνσταντίνο Ζήση για την συμπαράστασή του.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη στην εκπλήρωση των στόχων μου και ιδιαίτερα τον γιό μου Στάθη στον οποίο αφιερώνω την παρούσα εργασία.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	IX
Abstract	XIII
Ευχαριστίες	XV
Κατάλογος εικόνων	XXVI
Κατάλογος γραφημάτων	XXXII
Κατάλογος χρωματογραφημάτων	XXXV
Συντμήσεις	XXXVII
Κεφάλαιο 1^ο	- 2 -
Εισαγωγή.....	- 4 -
1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικού μεταβολισμού	- 6 -
1.1.1 Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα φυτά	- 6 -
1.1.1.1 Τερπένια	- 7 -
1.1.1.2 Φαινολικά συστατικά	- 12 -
1.1.1.3 Αλκαλοειδή	- 14 -
1.2 Καρκίνος	- 15 -
1.2.1 Μορφές κυτταρικού θανάτου	- 15 -
1.2.1.1 Απόπτωση	- 15 -
1.2.1.1.1 Σηματοδοτικές οδοί απόπτωσης	- 16 -
1.2.1.1.1.1 Ενδογενής μιτοχονδριακή σηματοδοτική οδός της απόπτωσης	-16-
1.2.1.1.1.2 Εξωγενής οδός των υποδοχέων θανάτου	-19-
1.2.1.1.1.2.1 Σηματοδοτική οδός των υποδοχέων Fas και TRAIL	-20-
1.2.1.1.1.2.2 Σηματοδοτική οδός των υποδοχέων TNFR1	-21-
1.2.1.1.1.2.3 Σηματοδοτική οδός των υποδοχέων TRAIL	-22-
1.2.1.1.1.3 Ενδογενής σηματοδοτική οδός του ενδοπλασματικού δικτύου	-24-
1.2.1.1.1.4 Σηματοδοτική οδός λυσοσωμάτων	-26-
1.2.1.1.1.5 Πρωτεΐνη p53 και ο ρόλος της στην απόπτωση	-28-
1.2.1.1.1.6 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και απόπτωση	-29-
1.2.1.2 Anoikis	- 31 -
1.2.1.3 Νέκρωση	- 33 -
1.2.1.4 Αυτοφαγία	- 35 -

1.2.1.5	Κυτταρικός κανιβαλισμός	35 -
1.2.1.5.1	Το φαινόμενο Endosis.....	36 -
1.2.2	Φυτικής προέλευσης συστατικά με αντικαρκινική δράση.....	37 -
1.3	Αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών.....	39 -
1.3.1	Χρήση αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων για φυτοπροστατευτικούς σκοπούς -	39 -
1.3.2	Χρήση αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	41 -
1.4	Σκοπός της διατριβής.....	44 -
Κεφάλαιο 2°		46 -
Πειραματικό μέρος		48 -
2.1	Υλικά και μέθοδοι.....	48 -
2.1.1	Όργανα και συσκευές.....	48 -
2.1.2	Αντιδραστήρια.....	49 -
2.1.3	Αναλώσιμα υλικά.....	52 -
2.2	Φυτικό Υλικό.....	54 -
2.2.1	Συλλογή φυτικού υλικού.....	54 -
2.2.2	Ταυτοποίηση φυτικού υλικού.....	54 -
2.2.3	Αποξήρανση φυτικού υλικού	54 -
2.2.4	Ομογενοποίηση φυτικού υλικού.....	55 -
2.2.5	Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών.....	56 -
2.2.5.1	Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων	56 -
2.2.5.2	Υδροαπόσταξη.....	56 -
2.3	Βιοδοκιμές.....	57 -
2.3.1	Έλεγχος αντικαρκινικής δράσης.....	57 -
2.3.1.1	Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549 και ινοβλαστών πνεύμονα.	58 -
2.3.1.1.1	Απόψυξη, ανασύσταση και ανάπτυξη κυττάρων.....	58 -
2.3.1.1.2	Ανακαλλιέργεια, συλλογή και διαμοιρασμός των κυττάρων.....	59 -
2.3.1.1.3	Διατήρηση κυττάρων.....	59 -
2.3.1.2	Βιοχημικά κριτήρια	59 -
2.3.1.2.1	Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των επιλεγμένων εκχυλισμάτων σε κύτταρα A549 με κυτταρομετρία ροής.....	59 -
2.3.1.2.1.1	Επίστρωση τρυβλίων με A549 κύτταρα.....	60-

2.3.1.2.1.2 Εφαρμογή εκχυλισμάτων.....	-61-
2.3.1.2.1.3 Απομόνωση κυττάρων.....	-61-
2.3.1.2.1.4 Κυτταρομετρία ροής.....	-62-
2.3.1.2.1.4.1 Στατιστική ανάλυση – αξιολόγηση αποτελεσμάτων.....	-62-
2.3.1.2.2 Διαλύματα εφαρμογής.....	- 63 -
2.3.1.2.2.1 Πρώτο προκαταρκτικό πείραμα: Προετοιμασία διαλυμάτων εφαρμογής.....	-63-
2.3.1.2.2.1.1 Δοκιμές διαλυτότητας.....	-63-
2.3.1.2.2.1.2 Δεύτερο προκαταρκτικό πείραμα: Εναλλακτικός τρόπος εφαρμογής των εκχυλισμάτων.....	-63-
2.3.1.2.2.2 Κυρίως πειράματα	-64-
2.3.1.2.2.2.1 Πείραμα 1ο: Πρώτη διερεύνηση (screening) της επίδρασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων.....	-64-
2.3.1.2.2.2.2 Πείραμα 2ο: Δοσοεξαρτώμενα πειράματα μεθανολικών εκχυλισμάτων σε A549 κύτταρα	-64-
2.3.1.2.2.2.3 Πείραμα 3ο: Διερεύνηση της βιοδραστικότητας αιθέριου ελαίου σε A549 κύτταρα.....	-64-
2.3.1.2.3 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωση κατά Western blot.....	- 65 -
2.3.1.2.3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	-65-
2.3.1.2.3.1.1 Λύση κυττάρων με υπερήχηση.....	-65-
2.3.1.2.3.1.2 Λύση κυττάρων με RIPA buffer.....	-65-
2.3.1.2.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford.....	-66-
2.3.1.2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS).....	-68-
2.3.1.2.3.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωση κατά Western blot.....	-71-
2.3.1.3 Έλεγχος μορφολογίας κυττάρων.....	- 73 -
2.3.1.3.1 Προετοιμασία μικροσκοπικών παρασκευασμάτων.....	- 75 -
2.3.1.3.1.1 Εφαρμογή εκχυλισμάτων (χρονοεξαρτώμενο – δοσοεξαρτώμενο πείραμα).....	-75-
2.3.1.3.1.2 Απομόνωση κυττάρων	-75-
2.3.1.3.1.3 Επίστρωση – στερέωση κυττάρων	-75-
2.3.1.3.2 Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης.....	- 75 -

2.3.1.3.3	Χρώση Giemsa.....	- 76 -
2.3.1.3.4	Χρώση DAPI.....	- 76 -
2.3.1.3.5	Χρώση Oil red O –Αιματοξυλίνης.....	- 77 -
2.3.1.3.6	Χρώση Παπανικολάου.....	- 78 -
2.3.2	Βιοδοκιμές σε φυτοπαθογόνους μύκητες.....	- 78 -
2.3.2.1	Απομόνωση και καλλιέργεια φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	- 79 -
2.3.2.1.1	Μέθοδος διάχυσης σε στερεό μέσο (Solid medium diffusion method).....	- 80 -
2.3.2.1.2	Μέθοδος εκτίμησης της επίδραση των πτητικών ενώσεων.....	- 81 -
2.3.2.1.3	Μέθοδος ενσωμάτωσης σε στερεό μέσο.....	- 83 -
2.3.2.2	Στατιστική ανάλυση.....	- 83 -
2.4	Ανάλυση εκχυλισμάτων.....	- 84 -
2.4.1	Αέρια χρωματογραφία – φασματογραφία μάζας (GC-MS).....	- 84 -
2.4.2	Δυναμική υπερκείμενης φάσης - αέριος χρωματογραφία – φασματογραφία μάζας (DHS-GC-MS).....	- 85 -
Κεφάλαιο 3 ^ο		- 88 -
Αποτελέσματα		- 90 -
3.1	Φυτικό Υλικό.....	- 90 -
3.2	Αποτελέσματα βιοδοκιμών.....	- 94 -
3.2.1	Αποτελέσματα ελέγχου πιθανής αντικαρκινικής δράσης.....	- 94 -
3.2.1.1	Αποτελέσματα βιοχημικού ελέγχου	- 94 -
3.2.1.1.1	Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής.....	- 94 -
3.2.1.1.1.1	Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων.....	-94-
3.2.1.1.1.1.1	1ο προκαταρκτικό πείραμα: Προετοιμασία διαλυμάτων εφαρμογής...-	94-
3.2.1.1.1.1.2	Αποτελέσματα δοκιμών διαλυτότητας.....	-98-
3.2.1.1.1.1.3	Αποτελέσματα 2ου Προκαταρκτικού πειράματος: Εναλλακτικός τρόπος εφαρμογής των εκχυλισμάτων	-99-
3.2.1.1.1.2	Αποτελέσματα κυρίως πειραμάτων.....	-99-
3.2.1.1.1.2.1	Πείραμα 1 ^ο : Πρώτη διερεύνηση της επίδρασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων (screening).....	-99-
3.2.1.1.1.2.2	Πείραμα 2ο: Δοσοεξαρτώμενα πειράματα μεθανολικών εκχυλισμάτων σε A549 κύτταρα.....	-101-

3.2.1.1.1.2.2.1 <i>O. vulgare</i> spp. <i>hirtum</i> (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL ⁻¹).....	-101-
3.2.1.1.1.2.2.2 <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> (0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL ⁻¹).....	-103-
3.2.1.1.1.2.2.3 <i>R. officinalis</i>	-105-
3.2.1.1.1.2.2.4 <i>T. polium</i>	-107-
3.2.1.1.1.2.2.5 <i>H. cyclophyllus</i>	-109-
3.2.1.1.1.2.3 Αποτελέσματα 3ου πειράματος: Διερεύνηση της βιοδραστικότητας αιθέριου ελαίου σε A549 κύτταρα.....	-110-
3.2.1.1.2 Αποτελέσματα ανοσοαποτώπωσης κατά Western blot.....	- 112 -
3.2.1.1.2.1 Εκχύλισμα <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i>	-112-
3.2.1.1.2.2 Εκχύλισμα <i>H. cyclophyllus</i>	-112-
3.2.1.2 Έλεγχος μορφολογίας κυττάρων.....	- 113 -
3.2.1.2.1 Χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης.....	- 113 -
3.2.1.2.1.1 Επίδραση εκχυλίσματος <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	-113-
3.2.1.2.1.2 Επίδραση εκχυλίσματος <i>H. cyclophyllus</i>	-114-
3.2.1.2.2 Χρώση May Grúnwald- Giemsa.....	- 116 -
3.2.1.2.2.1 Επίδραση εκχυλίσματος <i>S. horvatii</i> var. <i>macrophylla</i>	-116-
3.2.1.2.2.2 Επίδραση εκχυλίσματος <i>H. cyclophyllus</i>	-117-
3.2.1.2.3 Χρώση Oil red O – Αιματοξυλίνης.....	- 119 -
3.2.1.2.4 Χρώση DAPI.....	- 121 -
3.2.1.2.4.1 Επίδραση εκχυλίσματος του <i>S. horvatii</i> var. <i>macrophylla</i> στη μορφολογία των A549 πυρήνων.....	-121-
3.2.1.2.4.2 Επίδραση εκχυλίσματος του <i>H. cyclophyllus</i> στη μορφολογία των πυρήνων (A549 κύτταρα).....	-122-
3.2.1.2.5 Χρώση Παπανικολάου.....	- 125 -
3.2.1.2.1.1 Επίδραση εκχυλίσματος του <i>S. horvatii</i> var. <i>macrophylla</i> στη μορφολογία ινοβλαστών	-125-
3.2.1.2.1.2 Επίδραση εκχυλίσματος του <i>H. cyclophyllus</i> στη μορφολογία ινοβλαστών ..	-126-
3.3 Αποτελέσματα βιοδοκιμών σε φυτοπαθογόνους μύκητες.....	- 128 -
3.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια φυτοπαθογόνων.....	- 128 -
3.3.2 Αποτελέσματα εκτίμησης αντιμυκητικής δράσης του <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	- 129 -
3.3.2.1 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό μέσο	- 129 -

3.3.2.1.1	Αιθέριο έλαιο.....	- 129 -
3.3.2.1.2	Μεθανολικό εκχύλισμα.....	- 130 -
3.3.2.2	Αποτελέσματα επίδρασης πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου	- 131 -
3.3.2.2.1	1ο Πείραμα: 0-2.5-5-10-15-20 μL/τρυβλίο.....	- 131 -
3.3.2.2.2	2ο Πείραμα: 0-2-3-4-5-6 μL/τρυβλίο.....	- 132 -
3.3.2.3	Αποτελέσματα μεθόδου ενσωμάτωσης σε στερεό μέσο	- 135 -
3.3.2.3.1	<i>A. alternata</i>	- 135 -
3.3.2.3.2	<i>F. oxysporum lycopersici</i>	- 137 -
3.3.2.3.3	<i>Botrytis cinerea</i>	- 138 -
3.4	Αποτελέσματα Αναλύσεων.....	- 140 -
3.4.1	Περιεκτικότητα των <i>S. horvati</i> ssp. <i>macrophylla</i> & <i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> σε αιθέριο έλαιο.....	- 140 -
3.4.2	Αποτελέσματα GC-MS ανάλυσης	- 141 -
3.4.2.1	Αιθέριο έλαιο <i>O. vulgare</i> ssp <i>hirtum</i>	- 141 -
3.4.2.2	Ποιοτική σύσταση αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i>	- 143 -
3.4.2.3	Ποιοτική σύσταση μεθανολικού εκχυλίσματος και εκχυλίσματος εφαρμογής	- 146 -
3.4.2.4	Συλλογή πτητικών συστατικών του αρωματικού φυτού <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> με DHS και ανάλυσή τους με GC-MS.	- 149 -
Κεφάλαιο 4 ^ο		- 150 -
Συζήτηση		- 152 -
4.1	Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών	- 152 -
4.2	Έλεγχος πιθανής αντικαρκινικής δράσης επιλεγμένων MeOH εκχυλισμάτων.....	- 152 -
4.2.1	Κυτταρομετρία ροής	- 153 -
4.2.1.1	Πρώτη διερεύνηση (screening).....	- 153 -
4.2.1.2	Δοσοεξαρτώμενα πειράματα.....	- 154 -
4.2.1.2.1	Επίδραση επιλεγμένων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών.....	- 154 -
4.2.1.2.2	Επίδραση αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών.....	- 156 -
4.2.1.2.3	Επίδραση εκχυλίσματος φύλλων <i>H. cyclophyllus</i>	- 157 -
4.3	Περαιτέρω έλεγχος της αντικαρκινική δράση του φαρμακευτικού φυτού <i>H. cyclophyllus</i>	- 159 -

4.3.1	Προσδιορισμός πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot	159 -
4.3.2	Έλεγχος μορφολογίας A549 κυττάρων σε χρόνο και δοσοεξαρτώμενα πειράματα.....	159 -
4.3.3	Βιοδραστικά συστατικά- πιθανός τρόπος δράσης.....	162 -
4.4	Βιολογικές δράσεις <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	163 -
4.4.1	Αεριοχρωματογραφική ανάλυση (GC-MS) <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	164 -
4.4.1.1	Αιθέριου ελαίου	164 -
4.4.1.2	Μεθανολικό εκχύλισμα.....	165 -
4.4.1.3	Υδατικό εκχύλισμα εφαρμογής.....	165 -
4.4.1.4	Ανάλυση (DHS-GC-MS) πτητικών ενώσεων του φυτικού ιστού	166 -
4.4.2	Έλεγχος αντικαρκινικής δράσης του αρωματικού φυτού <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	166 -
4.4.2.1	Έλεγχος μορφολογίας A549 κυττάρων σε χρόνο και δοσοεξαρτώμενα πειράματα.....	166 -
4.4.2.2	Προσδιορισμός πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot	167 -
4.4.2.3	Βιοδραστικότητα συστατικών εφαρμοζόμενου μεθανολικού εκχυλίσματος στα A549 κύτταρα	167 -
4.4.3	Έλεγχος αντιμυκητικής δράσης.....	168 -
4.4.3.1	Βιοδραστικότητα αιθέριου ελαίου στα επιλεγμένα φυτοπαθογόνα.....	170 -
4.5	Περαιτέρω έρευνα.....	171 -
4.5.1	<i>H. cyclophyllus</i>	171 -
4.5.2	<i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i>	173 -
4.5.2.1	Αντικαρκινική δράση.....	173 -
4.5.2.2	Αντιμυκητική δράση.....	173 -
	Συμπεράσματα.....	174 -
	Βιβλιογραφία	176 -
 Παράρτημα Α: Αντιπροσωπευτικοί πίνακες αναφορικά με τα αποτελέσματα της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης (GC-MS) των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές, έπειτα από σύγκριση των φασμάτων μάζας των διαχωρισμένων συστατικών με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης Nist MS Search 2.0.....		
		-202-
 Παράρτημα Β: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα (GC-MS) των αιθέριων ελαίων και των επιλεγμένων εκχυλισμάτων.....		
		-210-
 Παράρτημα Γ: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μετρήσεων κυτταρομετρίας ροής.....		
		-218-

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση βιοσυνθετικών μονοπατιών των δευτερογενών μεταβολιτών (Πηγή: Καράταγλης).....	- 6 -
Εικόνα 2: Συντακτικός τύπος ισοπρενίου (C ₅ H ₈)	- 7 -
Εικόνα 3: Σκελετός φυτοστερολών.....	- 8 -
Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά της δομής των καρδιακών γλυκοζιτών (Πηγή: Cerella et al. 2013).	- 9 -
Εικόνα 5: Βασική δομή τριτερπενικής σαπωνίνης (Thakur et al. 2011).....	- 10 -
Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση σαπωνινών	- 10 -
Εικόνα 7: Διαδικασία σχηματισμού βιταμίνης –Α από β-καροτένιο (Καράταγλης 1999)	- 11 -
Εικόνα 8: Ταξινόμηση φαινολικών συστατικών	- 12 -
Εικόνα 9: Χημική δομή των σημαντικότερων κατηγοριών των διατροφικών πολυφαινολών (Πηγή: Martin & Appel 2010, τροποποιημένο)	- 13 -
Εικόνα 10: Τύποι αλκαλοειδών (Πηγή:www2.nsysu.edu.tw/MR/teacher/DuPR01.pdf).....	- 14 -
Εικόνα 11: Σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης: Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου. Στο ενδογενές μονοπάτι εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. Και τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν σε ενεργοποίηση της κασπάσης -3 (Πηγή: Calvino-Fernández & Parra-Cid 2010).	- 17 -
Εικόνα 12: Η ενεργοποιημένη κασπάση -3 διασπά την πρωτεΐνη PARP και ενεργοποιεί την CAD (Πηγή: http://cbm.msos.edu/scienceOlympiad/module2012/apoptosis.html)	- 18 -
Εικόνα 13: Προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη της υπερικογένειας Bcl2 των πρωτεϊνών (Πηγή: Tait & Green 2010)	- 19 -
Εικόνα 14: Σηματοδοτικό μονοπάτι των Fas και TRAIL (Πηγή: Jin & El-Deiry 2005)	- 20 -
Εικόνα 15: TNF Σηματοδοτικό μονοπάτι (Πηγή: El-Deiry 2005).....	- 21 -
Εικόνα 16: Τροποποιημένη σχηματική παράσταση των πέντε υποδοχέων TRAIL, (Πηγή: Kimberley & Screaton 2004).	- 23 -
Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του Σηματοδοτικού αποπτωτικού μονοπατιού που επάγεται από τον TRAIL (Πηγή: Kimberley& Screaton 2004).	- 24 -
Εικόνα 18: Σηματοδοτικά αποπτωτικά μονοπάτια του ενδοπλασματικού δικτύου (Πηγή: Breckenridge et al. 2003)	- 26 -
Εικόνα 19: Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου που επάγονται από τα λυσοσώματα (πηγή: Groth-Pedersen & Jäättelä 2013)	- 27 -
Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής της μεσολαβούμενης από την p 53 σηματοδοτικής οδού της απόπτωσης (Gillham et al. 2007)	- 28 -
Εικόνα 21: Το δίκτυο ιντεργκρίνης- ακτίνης-RTK (Πηγή: Hehlhans et al. 2006).....	- 31 -
Εικόνα 22: Σηματοδοτικά μονοπάτια ανοικis σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.(Πηγή: Kim et al. 2012).	- 32 -

Εικόνα 23: Πρωτεϊνικά σύμπλοκα που επάγονται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου TNFa και μεσολαβούν την ενεργοποίηση του NF-kB της απόπτωσης και της προγραμματισμένης νέκρωσης (necroptosis), (Πηγή : Yuan & Kroemer 2010).	- 34 -
Εικόνα 24: Η τύχη του εισερχόμενου κυττάρου κατά το φαινόμενο Endosis (Πηγή: Florey et al. 2010).....	- 36 -
Εικόνα 25: Φυτικής προέλευσης αντικαρκινικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη (Πηγή: Cragg & Newman, 2005 με τροποποιήσεις)	- 38 -
Εικόνα 26: Αποστακτική συσκευή με θερμομανδύα του Εργαστηρίου Αρωματικών και Βιομηχανικών Φυτών (Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου)	- 57 -
Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA	- 67 -
Εικόνα 28: Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Πηγή: Alberts 2000)	- 68 -
Εικόνα 29 (α,β): Σχηματική παράσταση βοθρίων (α) εφαρμογή αιθέριων ελαίων (β) εφαρμογή MeOH εκχυλίσματος του <i>S. horvatii</i>	- 81 -
Εικόνα 30: Σχηματική παράσταση τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές για την εκτίμηση της αντιμυκωτικής δράσης των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου (α) κάλυμμα τρυβλίου (β) βάση τρυβλίου.....	- 82 -
Εικόνα 31: <i>O. Vulgare</i> spp. <i>hirtum</i> (Ελληνική ρίγανη), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) λεπτομέρεια ταξιανθίας και γ) άνθους.....	- 91 -
Εικόνα 32: <i>C. capitatus</i> (Ισπανικά ρίγανη ή θυμάρι), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, γ) λεπτομέρεια ταξιανθίας.....	- 91 -
Εικόνα 33: <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> (Θρούμπι), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Παπαδάτες, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, γ) λεπτομέρεια Άνθους.	- 91 -
Εικόνα 34: <i>T. polium</i> (Παναγιώχορτο), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, λεπτομέρεια ταξιανθίας.	- 92 -
Εικόνα 35: <i>S. officinalis</i> (Φαρμακευτικό φασκόμηλο), α, β) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), γ) ανθισμένοι βλαστοί.	- 92 -
Εικόνα 36: <i>S. triloba</i> (Ελληνικό φασκόμηλο) συλλέχθηκε στην Πέρδικα, Δήμος Συβότων, Νομός Θεσπρωτίας) α, β) φυτό, γ) τρίλοβο φύλλο.....	- 92 -
Εικόνα 37: <i>S. triloba</i> (Ελληνικό φασκόμηλο) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή Ανόι, Δήμος Ανωγιατών, Νομός Πρεβέζης, τρίλοβα φύλλα.	- 92 -
Εικόνα 38: <i>C. incanus</i> (Κουνούκλα ή Λάβδανο), περιοχή συλλογής (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), ανθισμένοι βλαστοί.....	- 93 -
Εικόνα 39: <i>H. cyclophyllus</i> (Σκάρφη), περιοχή συλλογής (Ανόι, Δήμος Ανωγιατών, Νομός Πρεβέζης), λεπτομέρεια άνθους.	- 93 -
Εικόνα 40: <i>B. officinalis</i> (Μποράνγκο), περιοχή συλλογής (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), λεπτομέρεια άνθους (στερεοσκόπιο Laica, φωτογραφική μηχανή Sony).	- 93 -
Εικόνα 41: <i>M. azedarach</i> (Μέλια) στο στάδιο της άνθισης.....	- 94 -
Εικόνα 42: <i>Crategus oxycantha</i> (Μουρτζιά) στο στάδιο της άνθισης.	- 94 -

- Εικόνα 43:** Μικροσκοπική παρατήρηση ιζήματος αποξηραμένου και αναδιαλυμένου σε υδατικό μέσο μεθανολικού εκχυλίσματος. Διακρίνονται παρεγχυματικά κύτταρα..... - 98 -
- Εικόνα 44:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *O. vulgare* spp. *hirtum* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 0.5 mg mL⁻¹, (c) 1 mg mL⁻¹, (d) 2.5 mg mL⁻¹, (e) 5 mg mL⁻¹, (f) 10 mg mL⁻¹, (g) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K..... - 102 -
- Εικόνα 45:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. - 104 -
- Εικόνα 46:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *R. officinalis* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K..... - 106 -
- Εικόνα 47:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *T. polium* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. - 108 -
- Εικόνα 48:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος φύλλων του *H. cyclophyllus* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες (a) 0 mg mL⁻¹, μεγένθυση x100, (b) 6 mg mL⁻¹, μεγένθυση x100, (c) 6 mg mL⁻¹, μεγένθυση x400.. - 109 -
- Εικόνα 49:** Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *H. cyclophyllus* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση x100. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 μg mL⁻¹, (b) 100 μg mL⁻¹, β 200 μg mL⁻¹, (d) 400 μg mL⁻¹, (e) 600 μg mL⁻¹, (f) 900 μg mL⁻¹ (g) 1250 μg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. - 110 -
- Εικόνα 50:** Μικροσκοπική παρατήρηση ιζήματος κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 0.05 μL mL⁻¹ για 24 ώρες (X 600)..... - 111 -
- Εικόνα 51:** Μείωση επιπέδων της Προκασπάσης -3 σε A549 κύτταρα που δέχθηκαν επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (10 και 20 mg mL⁻¹) για 24 h όπως διαπιστώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot με την προσδιορισμό της β-Actin για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων. - 112 -
- Εικόνα 52:** Μείωση επιπέδων της Προκασπάσης -3 (αριστερά) και διάσπαση της PARP (δεξιά) σε A549 κύτταρα που δέχθηκαν επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* (0.1, 0.6 και 6 mg mL⁻¹) για 24 h όπως διαπιστώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot με την προσδιορισμό της β-Actin για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων. - 112 -

- Εικόνα 53:** Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 3-6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης (μεγέθυνση x600). Όπου αποπτωτικά σωμάτια, συμπυκνώματα χρωματίνης..... - 114 -
- Εικόνα 54:** Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0-0.6-6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 3-6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης –Ηωσίνης (μεγέθυνση x600)..... - 115 -
- Εικόνα 55:** Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grűnwald – Giemsa, μεγέθυνση x 600. - 117 -
- Εικόνα 56, Εικόνα 57:** Μορφολογικές διαφοροποιήσεις A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 6h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grűnwald – Giemsa, εικόνα 36 (αριστερά) μεγέθυνση x 600, εικόνα 36 (δεξιά) μεγέθυνση x 200. - 118 -
- Εικόνα 58:** Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0, 0.6, 6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grűnwald - Giemsa. - 119 -
- Εικόνα 59:** Κυστίδια που απομονώθηκαν από τον υπερκείμενο χώρο των A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 4 h. Τα κυστίδια παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με Oil red O – Αιματοξυλίνη..... - 120 -
- Εικόνα 60:** Κύτταρα A549 με χρώση και χωρίς χρώση Oil red O - Αιματοξυλίνης έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.6 mg mL⁻¹ για 24 h. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x400). - 120 -
- Εικόνα 61:** Πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0, 10 ,20 mg mL⁻¹ για 3, 6, 12, 24, 48 ώρες. Οι πυρήνες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (x 400). - 121 -
- Εικόνα 62:** Αποξηραμένο μεθανολικό εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* έπειτα από χρώση DAPI και πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹ για 12 h (αριστερά) όπως αυτά παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (x ?). - 122 -
- Εικόνα 63:** Πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0, 0.6, 6 mg mL⁻¹ για 3, 6, 12, 24, 48 ώρες. Οι πυρήνες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (x 400). Οι κύκλοι δείχνουν διπύρηνια κύτταρα με σχηματισμό μικροπυρήνων. - 124 -
- Εικόνα 64:** Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Παπανικολάου, μεγέθυνση x 400. - 125 -

- Εικόνα 65:** Μορφολογία πνευμονικών ινοβλαστών έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.1, 0.6, 6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση, μεγέθυνση x 400..... - 126 -
- Εικόνα 66:** *A. alternata* (α) προσβλημένος καρπός τομάτας (β) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA (γ) μικροσκοπική παρατήρηση αγενούς καρποφορίας - 128 -
- Εικόνα 67:** *B. cinerea* (α) προσβλημένος καρπός τομάτας (β) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA (γ) μικροσκοπική παρατήρηση αγενούς καρποφορίας - 128 -
- Εικόνα 68:** *F. oxysporum f.sp. lycopersici* (α&β) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA γ) μικροσκοπική παρατήρηση μακροκονιδίων..... - 128 -
- Εικόνα 69:** Τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιμυκητικής δράσης αιθέριου ελαίου του *S. horvatti* spp. *macrophylla* με τη μέθοδο της διάχυσης σε εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το βέλος σημειώνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση 15μL mL⁻¹. α,δ: *F. oxysporum*, β,ε: *B. cinerea*, γ,ζ: *A. alternata*. - 130 -
- Εικόνα 70:** Αντιμυκητική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στο μύκητα *B. cinerea* έπειτα από επώαση στους 26 °C για 6 μέρες. M: μάρτυρας, C2.5: 2.5 μL/ τρυβλίο, C5: 5 μL/ τρυβλίο, C10: 10 μL/ τρυβλίο, C15: 15 μL/ τρυβλίο, C20: 20 μL/ τρυβλίο - 132 -
- Εικόνα 71:** Αντιμυκητική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στον μύκητα *A. alternata* έπειτα από επώαση στους 26 °C για 7 μέρες. M: μάρτυρας, C2: 2μL/ τρυβλίο, C3: 3μL/ τρυβλίο, C4: 4μL/ τρυβλίο, C5: 5μL/ τρυβλίο, C6: 6μL/ τρυβλίο - 134 -
- Εικόνα 72:** Αντιμυκητική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στον μύκητα *F. oxysporum f. sp. lycopersici* έπειτα από επώαση στους 26 °C για 7 μέρες. M: μάρτυρας, C2: 2μL/ τρυβλίο, C3: 3μL/ τρυβλίο, C4: 4μL/ τρυβλίο, C5: 5μL/ τρυβλίο, C6: 6μL/ τρυβλίο - 135 -
- Εικόνα 73:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. alternata* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla* την 5^η μέρα. M: 0 μL/ τρυβλίο αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2,2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2,2% σε Tween 80 - 136 -
- Εικόνα 74:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum f. sp. lycopersici* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. M: 0 μL/ τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2.2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80..... - 138 -
- Εικόνα 75:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinereae* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2.2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. M: 0 μL/ τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2.2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80. - 138 -
- Εικόνα 76:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *O. vulgare* spp. *hirtum* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων..... - 220 -

- Εικόνα 77:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων..... - 221 -
- Εικόνα 78:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *T. polium* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων. - 222 -
- Εικόνα 79:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *R. officinalis* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων..... - 223 -

Κατάλογος γραφημάτων

- Γράφημα 1:** Αποτελέσματα 1^{ou} προκαταρκτικού πειράματος. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου. M1: Μη πλήρες Ham's F12K, M2: DMSO 0.45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, MeOH: Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), H_2O & 10% MeOH: εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), Hexane: Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), Chlorophorme: Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), Αιθέριο έλαιο: 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα M1..... - 95 -
- Γράφημα 2:** Αποτελέσματα 1^{ou} προκαταρκτικού πειράματος: Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν. M1: Μη πλήρες Ham's F12K, M2: DMSO 0,45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, MeOH: Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), H_2O & 10% MeOH: εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), Hexane: Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), Chlorophorme: Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), Αιθέριο έλαιο: 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K. - 96 -
- Γράφημα 3:** Αποτελέσματα 1^{ou} προκαταρκτικού πειράματος: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση νέκρωσης. M1: Μη πλήρες Ham's F12K, M2: DMSO 0.45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, MeOH: Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), H_2O & 10% MeOH: εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), Hexane: Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), Chlorophorme: Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), Αιθέριο έλαιο: 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K.....- 96 -
- Γράφημα 4:** Αποτελέσματα 1^{ou} προκαταρκτικού πειράματος: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ολικής απόπτωσης. M1: Μη πλήρες Ham's F12K, M2: DMSO 0.45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, MeOH: Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), H_2O & 10% MeOH: εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), Hexane: Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), Chlorophorme: Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), Αιθέριο έλαιο: 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K. - 97 -
- Γράφημα 5:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου 24 ώρες μετά την επίδραση των αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων (20 mg mL^{-1}) των επιλεγμένων φυτικών ειδών. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα (control)..... - 100 -
- Γράφημα 6:** Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν 24 ώρες μετά την επίδραση των αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων (20 mg mL^{-1}) των επιλεγμένων φυτικών ειδών. - 101 -
- Γράφημα 7:** Το *O vulgare* spp. *hirtum* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC/PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 20 mg mL^{-1} για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης, του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα ($P \leq 0.05$) συνοδεύονται από αστεράκι. - 102 -

- Γράφημα 8:** Το *S. horvatii* ssp. *macrophylla* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα (P≤0.05) συνοδεύονται από αστεράκι..... - 104 -
- Γράφημα 9:** Το *R. officinalis* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα (P≤0.05) συνοδεύονται από αστεράκι..... - 106 -
- Γράφημα 10:** Το *T. polium* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα (P≤0.05) συνοδεύονται από αστεράκι..... - 108 -
- Γράφημα 11:** Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης 0.05 μL mL⁻¹, περιεκτικότητας 0.45 μL mL⁻¹ σε DMSO..... - 110 -
- Γράφημα 12 :** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης 0.05 μL mL⁻¹, περιεκτικότητας 0.45 μL mL⁻¹ σε DMSO. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα..... - 110 -
- Γράφημα 13, Γράφημα 14:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση νέκρωσης (αριστερά) και απόπτωσης (δεξιά) 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης 0.05 μL mL⁻¹, περιεκτικότητας 0.45 μL mL⁻¹ σε DMSO. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα..... - 111 -
- Γράφημα 15:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. M.: Μάρτυρας, C2.5: 2.5 μL/ τρυβλίο, C5: 5 μL/ τρυβλίο, C10: 10 μL/ τρυβλίο, C15: 15 μL/ τρυβλίο, C20: 20 μL/ τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες. - 132 -
- Γράφημα 16:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *A. alternata*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. C2: 2μL/ τρυβλίο, C3: 3μL/ τρυβλίο, C4: 4μL/ τρυβλίο, C5: 5μL/ τρυβλίο, C6: 6μL/ τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες..... - 133 -
- Γράφημα 17:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum lycopersici*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. C2: 2μL/ τρυβλίο, C3: 3μL/ τρυβλίο, C4: 4μL/ τρυβλίο, C5: 5μL/ τρυβλίο, C6: 6μL/ τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες..... - 134 -

- Γράφημα 18:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum f. sp. lycopersici* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. M: 0 μ L/ τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2,2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μ L/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2,2% σε Tween 80. Οι μέσοι όροι (7η μέρα) που συνοδεύονται από τον ίδιο αριθμό δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Duncan $p \leq 0.05$). - 137 -
- Γράφημα 19:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2.2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. M: 0 μ L/ τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2.2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μ L/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80. Οι μέσοι όροι (7η μέρα) που συνοδεύονται από τον ίδιο αριθμό δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Duncan $p \leq 0.05$). - 139 -
- Γράφημα 20:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της περιεκτικότητας του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* σε αιθέριο έλαιο. Έτη συλλογής: 2009,2010. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό, Κ.Σ.: Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0.05$). - 140 -
- Γράφημα 21:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της περιεκτικότητας του *Origanum vulgare* ssp *hirtum* σε αιθέριο έλαιο. 2009,,2010: Έτη συλλογής. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό, Κ.Σ.: Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0.05$). - 140 -
- Γράφημα 22:** Ταξινόμηση των ταυτοποιημένων συστατικών αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *O. vulgare* spp *hirtum*..... - 142 -
- Γράφημα 23:** Ταξινόμηση των ταυτοποιημένων συστατικών αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό. Κ.Σ. Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό. - 145 -
- Γράφημα 24:** Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*..... - 146 -
- Γράφημα 25:** Ταξινόμηση ταυτοποιημένων συστατικών μεθανολικού εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. - 148 -

Κατάλογος χρωματογραφημάτων

- Χρωματογράφημα 1:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *O.vulgare* spp *hirtum* (αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 16. - 212 -
- Χρωματογράφημα 2:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla* (αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 17. - 213 -
- Χρωματογράφημα 3:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla* (Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 18. - 214 -
- Χρωματογράφημα 4:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα MeOH εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 19. - 215 -
- Χρωματογράφημα 5:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα υδατοδιαλυτού κλάσματος του αποξηραμένου MeOH εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 20. - 216 -
- Χρωματογράφημα 6:** Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα DHS-GC-MS φυτικού υλικού του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 21..... - 217 -

Συντμήσεις

1. **A549:** Κυτταρική καρκινική σειρά επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα τύπου II
2. **AIF:** apoptosis inducing factor – Παράγοντας που επάγει την απόπτωση
3. **AS:** Αυτόματος δειγματολήπτης
4. **CAD:** caspase-activated DNase – DNase ενεργοποιούμενη από κασπάσες
5. **DAPI:** 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
6. **Diablo:** Direct IAP binding protein with low pI – Πρωτεΐνη άμεσης πρόσδεσης σε IAP αναστολείς της απόπτωσης με χαμηλό PI.
7. **DHS:** Dynamic Head space δειγματολήπτη
8. **DMSO:** Διμέθυλο σουλφοξείδιο
9. **DRBC:** Θρεπτικό υλικό Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
10. **dw:** Dry Weight (ξηρό βάρος)
11. **EC50:** Half maximal effective concentration
12. **ΕΔ:** Ενδοπλασματικό δίκτυο
13. **GC:** Αέριος χρωματογράφος
14. **GRAS:** General Recognized As Safe
15. **FBS:** Ορός εμβρύου βοός
16. **HtrA2:** High temperature requirement protein A2 - Υψηλών απαιτήσεων πρωτεΐνη A2
17. **IAP:** Inhibitors of apoptosis proteins – Ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης
18. **MS:** Φασματογράφος μάζας
19. **MeOH:** Μεθανόλη
20. **PBS:** Phosphate buffered saline
21. **PDA:** Θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar
22. **PI:** Ιωδιούχο προπίδιο
23. **PS:** Phosphatidylserine
24. **ROS:** Reactive oxygen species- δραστικά οξυγονούχα είδη ενώσεων
25. **SMAC:** Second mitochondria derived activator of caspases - Δευτερεύον ενεργοποίησης των κασπασών προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια
26. **TRAIL:** Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand
27. **HPLC:** Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
28. **LC-MS:** Υγρή χρωματογραφία - φασματομετρίας μάζας

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

Ο άνθρωπος από την αρχή της υπάρξεώς του αναζήτησε την τροφή του για να καλύψει μία από τις βασικές του ανάγκες. Κατά την προσπάθειά του αυτή άρχισε να ανακαλύπτει τις θεραπευτικές, δηλητηριώδεις και άλλες ιδιότητες ορισμένων φυτών. Αργότερα άρχισε να χρησιμοποιεί την εμπειρική γνώση, την οποία απέκτησε κατά τη διάρκεια των χρόνων για να αντιμετωπίσει προβλήματα που σχετίζονται με την υγεία του, να προστατέψει τα φυτά που καλλιεργούσε από εχθρούς και ασθένειες, να συντηρήσει τα τρόφιμά του, αλλά και για καλλωπιστικούς σκοπούς. Η γνώση αυτή φτάνει μέχρι τις μέρες μας μέσω των συγγραμμάτων που έχουν διασωθεί από τη λαϊκή παράδοση, αλλά και την παραδοσιακή τους χρήση.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μία στροφή στη χρήση φυσικών προϊόντων, τόσο στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και αγροχημικών, όσο και στον τομέα των φαρμάκων. Το 25% περίπου των φαρμάκων που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά έχουν φυτική προέλευση (Shetty 1996, Calixto *et al.* 2000) και υπάρχει διεθνώς αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων από φυτά (phytomedicines). Η αναζήτηση φυτικής προέλευσης συστατικών για την αντιμετώπιση σοβαρών προβλημάτων της ανθρώπινης υγείας, όπως ο καρκίνος, συνεχίζει να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις μέρες μας (Balunas & Kinghorn 2005). Η ανάγκη εύρεσης νέων αντικαρκινικών φαρμάκων οφείλεται στις παρενέργειες που προκαλούν τα συνήθως χρησιμοποιούμενα θεραπευτικά μέσα στον ασθενή και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτά. Τα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης λόγω της μεγάλης ποικιλότητας συστατικών που διαθέτουν, παρουσιάζουν περισσότερες πιθανότητες για την ανακάλυψη νέων δραστικών ουσιών με αντικαρκινική δράση συγκριτικά με την συνθετική χημεία (Harvey 2000). Το επιστημονικό ενδιαφέρον στρέφεται στην αναζήτηση βιοδραστικών συστατικών που στοχεύουν στην επιλεκτική εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να προκαλούνται ανεπιθύμητες παρενέργειες στον ασθενή. Στο πλαίσιο αυτό η επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί έναν ενδιαφέροντα θεραπευτικό στόχο.

Εκτός από τον τομέα των φαρμάκων και στον τομέα των αγροχημικών υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για ανάπτυξη νέων, φυτικής προέλευσης, φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους. Ο πρώτος σχετίζεται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των φυτοπαρασίτων στις κλασσικές φυτοπροστατευτικές ουσίες, γεγονός που αυξάνει το κόστος αντιμετώπισης και ο δεύτερος αφορά τις δυσμενείς συνέπειες των κλασσικών

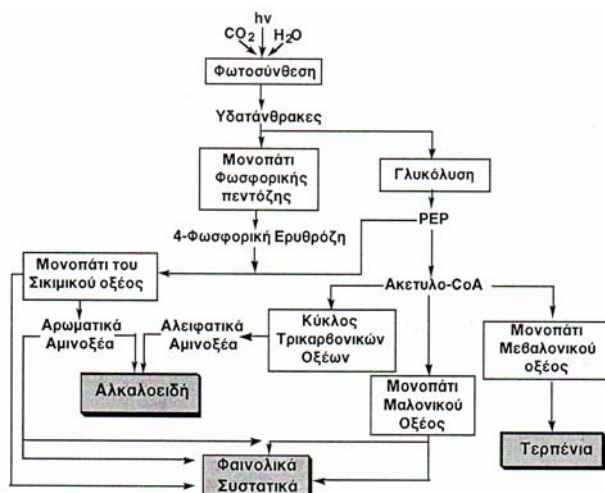
φυτοπροστατευτικών ουσιών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Μετά μάλιστα την απαγόρευση της χρήσης πολλών συμβατικών φυτοπροστατευτικών ουσιών, η αναζήτηση εναλλακτικών μέσων προστασίας των καρπών από μετασυλλεκτικές σήψεις παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφενός μεν λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος μεταξύ συγκομιδής και κατανάλωσης και αφετέρου λόγω της απαίτησης των καταναλωτών για ασφαλή τρόφιμα. Εναλλακτικές λύσεις αναζητώνται επίσης για την αντιμετώπιση εδαφογενών φυτοπαθογόνων, λόγω της μειωμένης αποτελεσματικότητας των συμβατικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων και του υψηλού κόστους καταπολέμησης.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι η χώρα μας κατατάσσεται ανάμεσα στις πρώτες θέσεις παγκοσμίως, λόγω της πλούσιας και μοναδικής βιοποικιλότητας που διαθέτει. Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει περισσότερα από 6.000 είδη φυτών (Vocou et al. 1993), από τα οποία ένα στα πέντε (1.200 περίπου) φυτικά είδη είναι ενδημικά (Μαλούπα 2012). Οι φυτοχημικές μελέτες είναι περιορισμένες και ο φυσικός αυτός πλούτος παραμένει σε μεγάλο βαθμό ακόμα αναξιοποίητος. Οι νέες αναλυτικές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια στον τομέα της χημείας επιτρέπουν το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πολυάριθμων συστατικών τους, τη μελέτη του τρόπου δράσης τους στον βιοχημικό κυτταρικό μηχανισμό και τη διαπίστωση των φαρμακευτικών ή βιολογικών τους ιδιοτήτων. Η επιλογή των φυτών μπορεί να περιλαμβάνει είδη με γνωστή βιολογική δράση τα οποία χρησιμοποιούνται παραδοσιακά, αλλά το δραστικό συστατικό δεν έχει απομονωθεί ή ακόμα μπορεί να αφορά την τυχαία συλλογή και συμμετοχή σε ένα ευρύ πρόγραμμα επιλογής (Balunas & Kinghorn 2005). Ενδιαφέρον ανάμεσα σε άλλα είδη παρουσιάζουν τα αρωματικά φυτά τα οποία παράγουν πτητικές ενώσεις, γνωστές ως αιθέρια έλαια. Όπως έχει ερευνητικά διαπιστωθεί εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες (Christaki et al 2012) όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, εντομοαπωθητική ή εντομοτοξική κ.ά. (Svoboda & Hampson 1999, Koroch et al. 2007, Edris 2007, Bhalla et al. 2013, Adorjan & Buchbauer 2010). Η δυνατότητα αξιοποίησης των αιθέριων ελαίων με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες, εναλλακτικά των συμβατικών φυτοπροστατευτικών ουσιών, μελετάται σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπαρασίτων (Regnault – Rogers 1997), ενώ η χρήση τους επιτρέπεται και στη βιολογική γεωργία για φυτοπροστατευτικούς σκοπούς.

1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικού μεταβολισμού

1.1.1 Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα φυτά

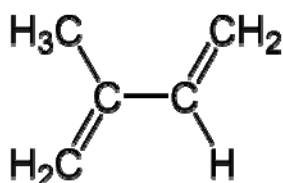
Οι βιολογικές δράσεις των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών, οφείλονται σε δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτικού μεταβολισμού, οι οποίοι αναφέρονται συνήθως ως δευτερογενή ή φυσικά προϊόντα. Τα συστατικά αυτά δεν αποτελούν βασικά δομικά συστατικά του φυτικού κυττάρου. Η παρουσία τους δεν είναι απαραίτητη για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη του φυτού (Καράταγλης 1999). Αρχικά θεωρήθηκαν ως άχρηστα προϊόντα της μεταβολικής διαδικασίας (Harborne 1990, Stahl-Biskup & Saez 2002). Όμως το ενεργειακό κόστος για τη σύνθεση κάθε δευτερογενούς μεταβολίτη είναι υψηλό. Το φυτό δεν μπορεί να δαπανά ενεργειακά για κάτι που του είναι άχρηστο. Αργότερα διαπιστώθηκε πως οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαδραματίζουν συχνά ρόλο στις σχέσεις φυτού με άλλους οργανισμούς και τους αβιοτικούς παράγοντες, ανοίγοντας ένα πεδίο έρευνας (Καράταγλης 1999) που ονομάζεται χημική οικολογία ή οικολογική βιοχημεία (Chemical ecology). Το φυτό με τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγει μπορεί να προστατευθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς, να αποτρέψει την προσβολή του από κάποιο φυτοφάγο έντομο ή τη βόσκησή του από κάποιο ζώο, να προσελκύσει τους επικονιαστές του, να επηρεάσει την βλάστηση και εδραίωση άλλων φυτών στο περιβάλλον του, να επουλώσει τις πληγές του (Σκρουμπής 1985, 1998, Kintzios 2000, Καράταγλης 1994). Τα τερπένια, τα φαινολικά συστατικά και τα αλκαλοειδή είναι οι τρεις σημαντικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα φυτά (**Εικόνα 1**). Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται στον τρόπο βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών.



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση βιοσυνθετικών μονοπατιών των δευτερογενών μεταβολιτών (Πηγή Καράταγλης)

1.1.1.1 Τερπένια

Τα τερπένια (terpens) αποτελούν την πιο πολυπληθή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα φυτά. Είναι λιπόφιλα συστατικά τα οποία συντίθενται από το ακέτυλο CoA μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος και προέρχονται από τη συνένωση δύο ή περισσότερων δομικών μονάδων που έχουν τον διακλαδισμένο ανθρακικό σκελετό του ισοπρενίου (**Εικόνα 2**). Με την συνένωση δύο τέτοιων δομικών μονάδων σχηματίζουν τα μονοτερπένια (C₁₀), με 3 τα σεσκιτερπένια (C₁₅) με 4 τα διτερπένια (C₂₀). Μεγαλύτερα τερπενικά μόρια αποτελούν τα τριτερπένια (C₃₀) και τα πολυτερπένια (Καράταγλης 1999, Kintzios 2000) (**Πίνακας 1**). Τα τερπένια που περιέχουν στο μόριό τους οξυγόνο ονομάζονται τερπενοειδή (terpenoids) (Bakkali et al. 2008).



Εικόνα 2: Συντακτικός τύπος ισοπρενίου (C₅H₈)

Πίνακας 1: Σχέση μεταξύ ισοπρενοειδών

Βασικό μόριο	Ισοπρένιο (C ₅ H ₈)				
Επανάληψη	X 2	X 3	X 4	X 6	X n
Μοριακός τύπος	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₅ H ₂₄	C ₂₀ H ₃₂	C ₃₀ H ₄₈	C _{5n} H _{8n}
Κλάση τερπενίων	Μονοτερπένια	Σεσκιτερπένια	Διτερπένια	Τριτερπένια	Πολυτερπένια

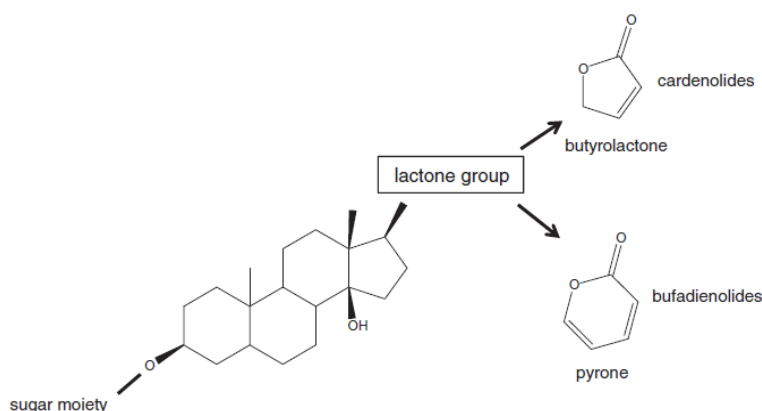
Πολλά από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων που παράγουν τα αρωματικά φυτά αποτελούνται από τερπένια, μικρού μοριακού βάρους, κυρίως μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και σε μικρότερο βαθμό διτερπένια. Παράγονται σε εξειδικευμένους εκκριτικούς σχηματισμούς των φυτών όπως είναι οι ελαιοφόρες τρίχες (ρίγανη, δυόσμος), οι ελαιοφόρες κοιλότητες (εσπεριδοειδή), οι ελαιοφόροι αγωγοί (σέλινο, μάραθο), τα ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα (δάφνη) (Κωφίδης 2004). Τα αιθέρια έλαια εκτός του ότι προσδίδουν στο φυτικό υλικό που τα παράγει χαρακτηριστική οσμή και γεύση (Samuelsson 1996), παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις. Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα έχει διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένα αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών ή βιοδραστικά συστατικά τους επηρεάζουν τη συμπεριφορά ή την βιολογία συγκεκριμένων εντόμων (Isman 2000, Regnault–Rogers 1997, Υφαντή 2006). Ορισμένα διαθέτουν αντιβακτηριακή, αντιμυκητική,

Στα τριτερπένια (30 C) ανήκουν συστατικά, όπως τα στεροειδή (στερόλες), οι καρδιακοί γλυκοζίτες και οι σαπωνίνες (Καράταγλης 1999).

Οι γλυκοζίτες αποτελούνται από ένα σάκχαρο ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα άγλυκο τμήμα. Το σάκχαρο βρίσκεται στην κυκλική μορφή του και το σημείο σύνδεσης είναι η ημιακεταλική υδροξυλομάδα. Το συνηθέστερο άτομο γεφύρωσης είναι το οξυγόνο (Ο-γλυκοζίτης), μπορεί όμως

να είναι και το θείο (S- γλυκοζίτης), το άζωτο (N- γλυκοζίτης), ο άνθρακας (C- γλυκοζίτης). Οι α και β γλυκοζίτες διακρίνονται από τη διαμόρφωση της ημιακεταλικής υδροξυλομάδας.

Τα άγλυκα τμήματα των καρδιακών γλυκοζιτών είναι στεροειδή των οποίων η πλευρική αλυσίδα είναι ένας πενταμελής ή εξαμελής ακόρεστος λακτονικός δακτύλιος. Ο πυρήνας του στεροειδούς συνδέεται με ένα σάκχαρο στη θέση 3 (C 3) και ένα δακτύλιο λακτόνης στη θέση 17 (C 17). Η φύση του δακτυλίου της λακτόνης διαχωρίζει τους καρδιακούς γλυκοζίτες σε δύο ομάδες. Στις καρδενολίδες που περιλαμβάνουν έναν πενταμελή ακόρεστο δακτύλιο βουτυρολακτόνης, ενώ τα μπουφαδιενολίδια διαθέτουν έναν εξαμελή ακόρεστο δακτύλιο πυρόνης (Εικόνα 4) (Cerella et al. 2013, Pongrakhananon 2013). Η φαρμακολογική δράση των καρδιακών γλυκοζιτών οφείλεται κυρίως στο άγλυκο. Το τμήμα του σακχάρου αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα των ενώσεων και τροποποιεί την ένταση και την διάρκεια της δράσεως. Ο ακόρεστος λακτονικός δακτύλιος είναι απαραίτητος για την εμφάνιση της φαρμακολογικής δράσης (Samuelson 1994).

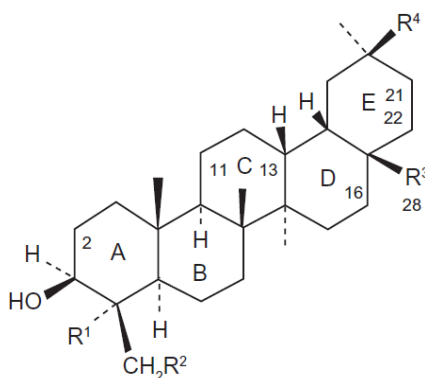


Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά της δομής των καρδιακών γλυκοζιτών (Πηγή: Cerella et al. 2013).

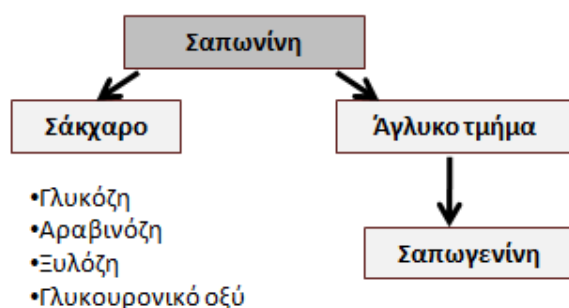
Τα συστατικά αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως δηλητήρια για βέλη, για τη διακοπή της κύησης, ως διουρητικά, εμετικά και καρδιοτονωτικά (Newman et al. 2008, Winnicka et al. 2006, Kumar 2013). Παρόλο που οι καρδιακοί γλυκοζίτες εμφανίζουν τοξικότητα στα ανώτερα σπονδυλωτά (Καράταγλης 1999) σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν εξειδικευμένη δράση στην καρδιακή συστολή και την κολποκοιλιακή αγωγιμότητα (Samuelson 1991). Φυτικής προέλευσης καρδιακοί γλυκοζίτες όπως τα digitalin και digoxin χρησιμοποιούνται εδώ και 200 χρόνια για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας και της καρδιακής αρρυθμίας (Katz et al. 2010, Kumar 2013) και σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες παρουσιάζουν ενδιαφέρον για

την αντικαρκινική τους δράση (Daniel et al. 2003, López-Lázaro 2007, Prassas et al. 2011, Juncker et al. 2011, Calderón-Montaño et al. 2013 a, Calderón-Montaño et al. 2013 b, Cerella et al. 2013).

Οι σαπωνίνες απαντώνται ως γλυκοζίτες κυκλικών τριτερπενίων ή ως γλυκοζίτες στεροειδών (Thakur et al. 2011). Οι στεροειδείς σαπωνίνες (C 27) μπορούν να έχουν σκελετό σπιροστανίου (6 δακτυλίων) ή φουροστανίου (5 δακτυλίων), ενώ οι τριτερπενικές σαπωνίνες αποτελούνται από 30 άτομα άνθρακα (C 30) που αποτελούνται συνήθως από 5 και σπανιότερα 4 δακτυλίους (**Εικόνα 5**). Κατά την υδρόλυσή τους δίνουν μια σειρά σακχάρων και το άγλυκο συστατικό που ονομάζεται σαπωνγενίνη (**Εικόνα 6**). Ονομάστηκαν έτσι διότι με το νερό σχηματίζουν αφρό (Καράταγλης 1999).



Εικόνα 5: Βασική δομή τριτερπενικής σαπωνίνης (Thakur et al. 2011)

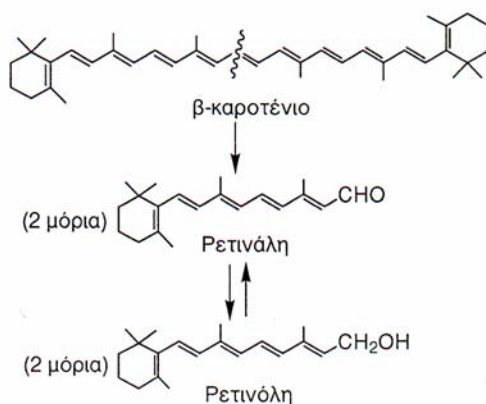


Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση σαπωνινών

Λόγω της αμφιπολικότητας του μορίου τους, που οφείλεται στο υδρόφιλο σάκχαρο και την υδρόφοβη σαπωνγενίνη (Podolak et al. 2010), μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες, αλλά και να μειώνουν την επιφανειακή τάση σε ένα υδατικό διάλυμα (Thakur et al. 2011). Οι σημαντικότερες φαρμακολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις σαπωνίνες αφορούν

τη μείωση των επιπέδων χολιστερόλης στον ορό, τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Francis et al. 2002), την κυτταροτοξική (Podolak et al. 2010), χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση (Raju & Mehta 2009, Podolak et al. 2010). Μερικές εμφανίζουν και τοξικές ιδιότητες αφού έχουν την ικανότητα να αποδιοργανώνουν τις μεμβράνες και να προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Καράταγλης 1999). Οι δρόγες που περιέχουν τριτερπενικές σαπωνίνες χρησιμοποιούνται ως αποχρεμπτικά. Η σαπωνίνη διεγείρει την έκκριση μιας αραιής βλέννης, η οποία διευκολύνει την απόχρεμψη σε περιπτώσεις φλεγμονών του αναπνευστικού συστήματος. Οι σαπωνίνες διαθέτουν και απορρυπαντικές ιδιότητες. Χρησιμοποιούνται για την ελάττωση της επιφανειακής τάσεως, ως γαλακτοματοποιητές και ως συστατικό των πυροσβεστήρων (Samuelson 1994).

Στα τετρατερπένια (C 40) ανήκουν τα καροτενοειδή, τα οποία είναι λιποδιαλυτές χρωστικές που βρίσκονται στους φωτοσυνθετικούς ιστούς. Τα καροτενοειδή, τα οποία μπορεί να είναι άκυκλα (πχ λυκοπένιο), μονοκυκλικά (πχ. γ-καροτένιο) ή δικυκλικά (πχ. α-καροτένιο, β-καροτένιο κλπ), διακρίνονται στα καροτένια και τις ξανθοφύλλες (Καράταγλης 1994). Τα καροτένια, τα οποία έχει διαπιστωθεί, ότι προστατεύουν τους ζωικούς οργανισμούς από την υπεριώδη ακτινοβολία (Sies & Stahl 2004), διαθέτουν κίτρινο, πορτοκαλί χρώμα, το οποίο οφείλεται στην ύπαρξη ενός ελάχιστου αριθμού διπλών δεσμών στο μόριό τους (Καράταγλης 1994), που απορροφούν έντονα στο ορατό φως Samuelson 1996). Οι ξανθοφύλλες είναι οξυγονούχα παράγωγα των αντίστοιχων καροτένιων. Τα καροτένια αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης-Α (ρετινόλη) **(Εικόνα 7)** (Καράταγλης 1994, Omenn et al. 1996). Σύμφωνα με έρευνες η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε β-καροτένια (κίτρινες, μωβ χρωστικές) μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Omenn et al. 1996).

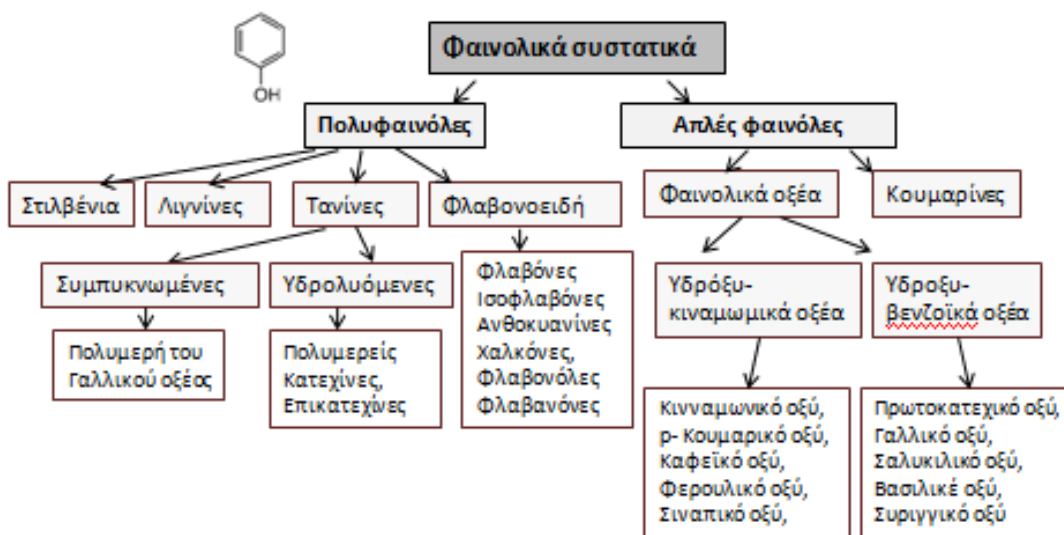


Εικόνα 7: Διαδικασία σχηματισμού βιταμίνης -Α από β-καροτένιο (Καράταγλης 1999)

1.1.1.2 Φαινολικά συστατικά

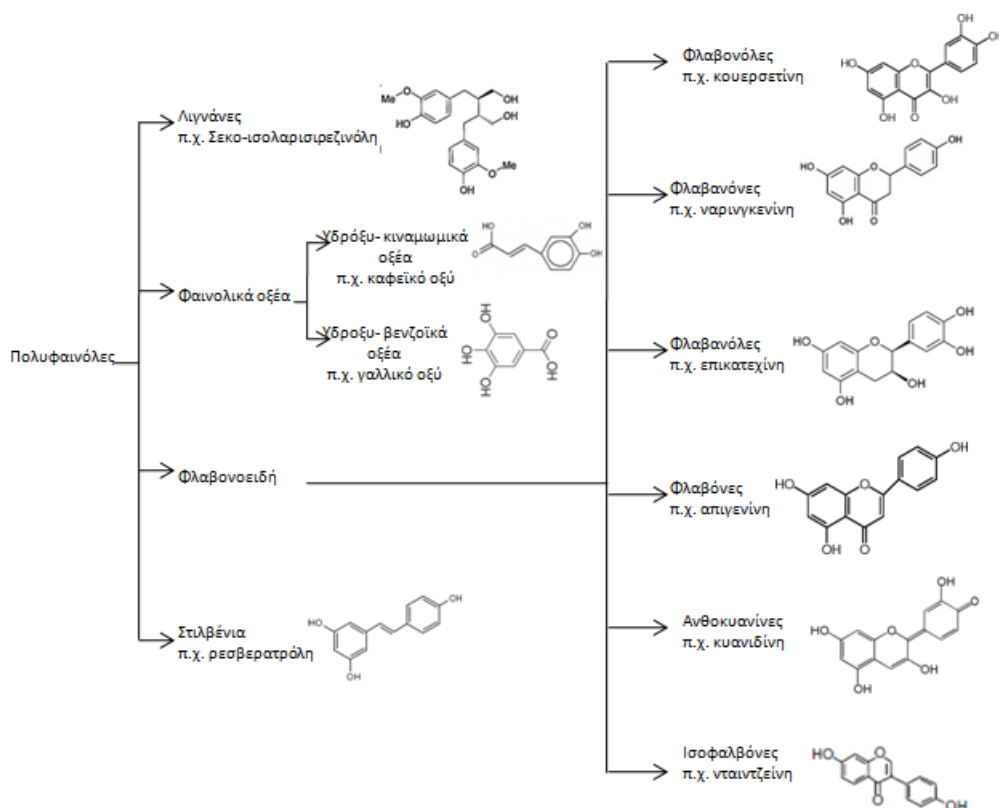
Τα φαινολικά συστατικά βιοσυντίθενται κυρίως μέσω του μονοπατιού του σικιμικού ή του μαλονικού οξέος. Χαρακτηρίζονται από έναν αρωματικό δακτύλιο στο μόριό τους, ο οποίος φέρει τουλάχιστον μία OH^- ομάδα συνδεδεμένη με ένα άτομο άνθρακα (C) του πυρήνα ή άλλα παράγωγα. Πολλές φορές απαντώνται υπό μορφή γλυκοζιτών αποτελούν το άγλυκο τμήμα τους. Παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς την διαλυτότητά τους. Ορισμένα είναι διαλυτά μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλα είναι υδατοδιαλυτά (καρβοξυλικά οξέα και γλυκοζίτες), ενώ άλλα είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή Καράταγλης 1999). Οι φαινόλες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλότητα στο φυτικό βασίλειο. Ορισμένα φαινολικά συστατικά προστατεύουν το φυτό που τα παράγει από φυτοφάγους (πχ. ταννίνες) (Barbehenn & Constabel 2011) και φυτοπαθογόνους οργανισμούς (πχ. ισοφλαβονοειδή, φυτοαλεξίνες), άλλα διαθέτουν αλληλοπαθητικές ιδιότητες και επηρεάζουν την αύξηση γειτονικών φυτών, κάποια προσελκύουν τους επικονιαστές (πχ. ανθοκυανίνες, φλαβονόλες) (Koes et al. 1994) ή δρουν ως χημικοί διαμεσολαβητές (κυρίως φλαβονοειδή) στις συμβιωτικές σχέσεις φυτών-μικροοργανισμών (μυκόριζες, αζωτοβακτήρια) (Koes et al 1994, Phillips & Karulnik 1995), ενώ ορισμένα χρησιμεύουν για μηχανική υποστήριξη και προστασία (πχ. λιγνίνες).

Οι φαινολικές ενώσεις ταξινομούνται (**Εικόνα 8**) στις απλές φαινόλες και τις πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες υποδιαιρούνται στα φλαβονοειδή (φλαβόνες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, κ.λ.π.), τις ταννίνες (συμπυκνωμένες ταννίνες: πολυμερείς κατεχίνες, επικατεχίνες, υδρολυόμενες ταννίνες: πολυμερή του γαλλικού οξέος), τα στυλβένια και τις λιγνίνες.



Εικόνα 8: Ταξινόμηση φαινολικών συστατικών

Οι απλές φαινόλες υποδιαιρούνται στα φαινολικά οξέα (υδρόξυ-κινναμωμικά οξέα: κινναμωνικό οξύ, p- Κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, χλωρογενικό οξύ και υδροξυ-βενζοϊκά οξέα: πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ) και τις κουμαρίνες. Στην **Εικόνα 9** αναφέρεται η χημική δομή των κυριότερων κατηγοριών διατροφικών πολυφαινολών.

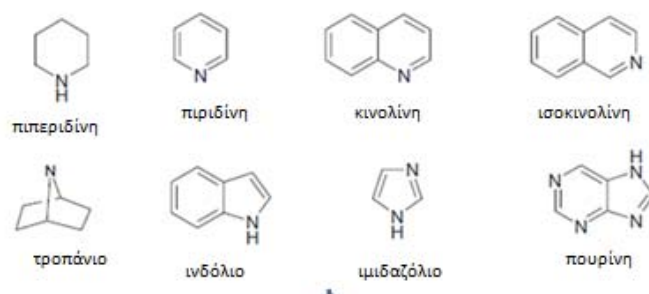


Εικόνα 9: Χημική δομή των σημαντικότερων κατηγοριών των διατροφικών πολυφαινολών (Πηγή: Martin & Appel 2010, τροποποιημένο)

Οι φαινόλες που περιέχονται στα φρούτα, τα λαχανικά και τα όσπρια αποτελούν σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής. Λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Kähkönen et al. 1999, Velioglu et al. 1998), καταστέλλουν βλαβερές οξειδωτικές διεργασίες (οξειδωτικό στρες) και σύμφωνα με in vitro, αλλά και επιδημιολογικές μελέτες προστατεύουν την ανθρώπινη υγεία από διάφορες μορφές καρκίνου (Wahle et al. 2010) αλλά και από άλλες χρόνιες ασθένειες, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης τύπου 2, οι λιμώξεις, η γήρανση και το άσθμα (Pandey & Rizvi 2009).

1.1.1.3 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι αζωτούχες ενώσεις με αλκαλική αντίδραση και σε αυτό οφείλουν το όνομά τους. Το άτομο N σε αυτά τα συστατικά είναι μέλος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου που περιέχει τόσο το άτομο του αζώτου όσο και το άτομο του C. Βιοσυντίθενται πρωτογενώς από αμινοξέα (Καράταγλης 1999, Kintzios 2000). Οι τύποι μερικών ομάδων αλκαλοειδών αναφέρονται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 10**)



Εικόνα 10: Τύποι αλκαλοειδών (Πηγή: www2.nsysu.edu.tw/MR/teacher/DuPR01.pdf)

Συνήθως βιοσυντίθενται στους βλαστούς των φυτών με εξαίρεση τη νικοτίνη που βιοσυντίθεται στις ρίζες. Τα περισσότερα αλκαλοειδή είναι τοξικά για τα θερμόαιμα όταν προσλαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ πολλά σε μικρότερες δόσεις είναι χρήσιμα από φαρμακολογικής άποψης. Η μορφίνη, η κωδεΐνη, η κινίνη, η ατροπίνη και η εφεδρίνη είναι συστατικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική, ενώ άλλα αλκαλοειδή όπως η κοκαΐνη, η νικοτίνη και η καφεΐνη χρησιμοποιούνται ως διεγερτικά ή ηρεμιστικά.

1.2 Καρκίνος

Ο Καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά ενός όγκου είναι η αύξηση του αριθμού των κυττάρων του. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται, είτε σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είτε σε ελαττωμένο κυτταρικό θάνατο (Aggarwal 2000) ή και στα δύο (Νικολοπούλου & Μιχαλοπούλου 1997). Στόχος μίας επιτυχούς χημειοθεραπείας είναι η επιλεκτική εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων χωρίς αυτή να συνοδεύεται από σοβαρές παρενέργειες για τον ασθενή.

1.2.1 Μορφές κυτταρικού θανάτου

Η απόπτωση (Apoptosis) και η νέκρωση (Necrosis) είναι δύο διαφορετικές μορφολογικά και βιοχημικά μορφές κυτταρικού θανάτου (Wyllie et al. 1980, Leist et al. 1997). Η μορφή του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από την ένταση και την διάρκεια των ερεθισμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου (Ανδρίκουλα & Βαρθολομάτος 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ATP είναι καθοριστικός παράγοντας και επηρεάζει τη μορφή του κυτταρικού θανάτου. Έτσι κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της απόπτωσης μπορεί στη συνέχεια να υποστούν νέκρωση λόγω ελάττωσης των ενεργειακών τους επιπέδων (Leist et al. 1997).

Εκτός από τις δύο αυτές βασικές μορφές κυτταρικού θανάτου έχουν περιγραφεί από ερευνητές και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η όγκωση (Oncosis) (Majno & Joris 1995) και η νεκρόπτωση (Necroptosis) (Kroemer et al. 2009), οι οποίες είναι μορφές κυτταρικού θανάτου που δεν διαχωρίζονται σαφώς από τη νέκρωση, ενώ η αυτοφαγία (Autophagy) μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο κάτω από δεδομένες συνθήκες (Edinger & Thompson 2004). Τα φαινόμενα Ανοίικς (Anoikis) (Frisch & Screaton 2001) και Έντοσης (Entosis) (Overholtzer et al. 2007) αφορούν μορφές κυτταρικού θανάτου που παρατηρούνται σε επιθηλιακά κύτταρα μετά την αποκόλλησή τους από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Το φαινόμενο της έντοσης παρουσιάζει τόσο ομοιότητες όσο και διαφορές από το φαινόμενο του κυτταρικού κανιβαλισμού (Yang & Li 2012).

1.2.1.1 Απόπτωση

Ο ελληνικός όρος απόπτωση (από + πτώση), ο οποίος αναφέρεται στο πέσιμο των γηρασμένων φύλλων από τα δέντρα το φθινόπωρο, έχει καθιερωθεί διεθνώς για την απόδοση μίας ενδογενούς αυστηρά ρυθμιζόμενης διαδικασίας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία είναι

απαραίτητη για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων κυττάρων, τη φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών στους πολυκύτταρους οργανισμούς (Kerr et al. 1972, Jin & El-Deiry 2005). Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Kerr και τους συνεργάτες του το 1972.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης περιλαμβάνουν συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, πύκνωση και περιφερειακή διάταξη της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει πτυχώσεις χωρίς να παρατηρείται απώλεια της ακεραιότητάς της. Πυρηνικό και κυτταροπλασματικό υλικό περιβάλλεται από μεμβράνες, σχηματίζονται αποπτωπικά σωμάτια, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από γειτονικά κύτταρα και μακροφάγα (Kerr et al. 1972, Jin & El-Deiry 2005, Elmor 2007).

Οι βιοχημικοί δείκτες της απόπτωσης αφορούν την μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της κυττοπλασματικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των κασπασών (προτεασών) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν ενδονουκλεάσες, οι οποίες κατακερματίζουν το DNA στα νουκλεοσώματα. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν την απόπτωση εξαρτώνται από την ενεργοποίηση των κασπασών (Faddeel et al. 2005, Hengartner 2000).

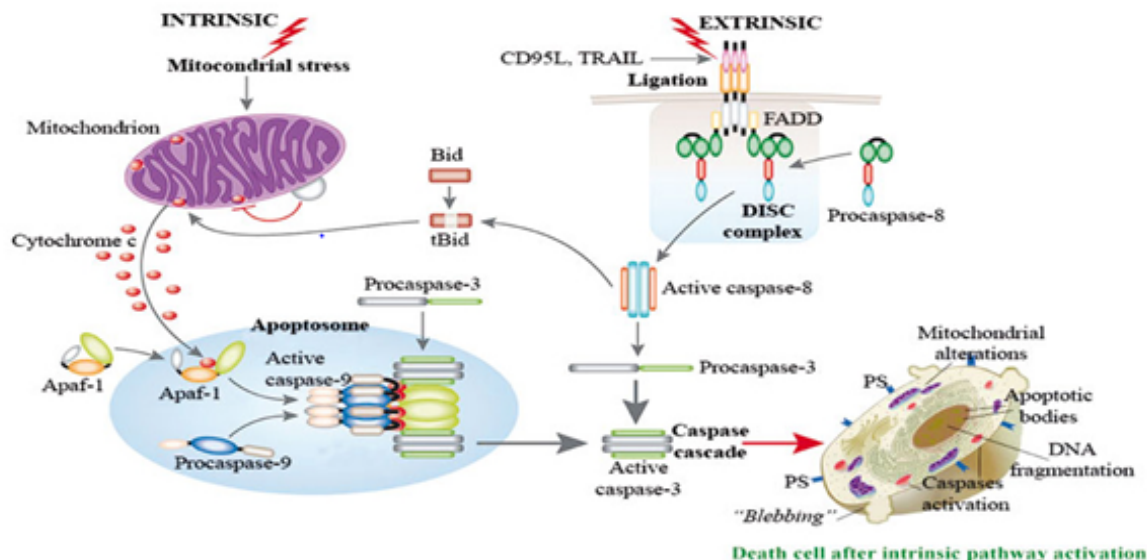
Η κατανόηση του μηχανισμού της απόπτωσης είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή τα καθιστούν ευαίσθητα σε καθιερωμένους θεραπευτικούς παράγοντες και στην ακτινοθεραπεία. Πλήθος γονιδίων συμμετέχουν στην ρύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης και διακρίνονται σε εκείνα που την επάγουν (p53, c-myc, E2F, Fas, Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs) και εκείνα που την αναστέλλουν (όπως Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1, A-I, crmA, p35). Στόχος είναι η επαγωγή ή η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που προάγουν την απόπτωση και η αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που την αναστέλλουν (Νικολοπούλου & Μιχαλοπούλου 1997, Νομικός 2006).

Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί δύο κύρια αποπτωτικά κασπασο-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια (**Εικόνα 11**), το ενδογενές (ή μιτοχονδριακό) μονοπάτι και το εξωγενές μονοπάτι (ή μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου) (Jin & El-Deiry WS 2005).

1.2.1.1.1 Σηματοδοτικές οδοί απόπτωσης

1.2.1.1.1.1 Ενδογενής μιτοχονδριακή σηματοδοτική οδός της απόπτωσης

Ενδοκυττάρια σήματα που περιλαμβάνουν βλάβες στο DNA προκαλούμενες από ακτινοβολία, χημικά, αναστολή αυξητικών παραγόντων ή οξειδωτικό stress ενεργοποιούν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης στο οποίο εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. Για αυτό ονομάζεται και μιτοχονδριακό μονοπάτι (Jin & El-Deiry 2005).



Εικόνα 11: Σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης: Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου. Στο ενδογενές μονοπάτι εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια. Και τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν σε ενεργοποίηση της κασπάσης -3 (Πηγή Calvino-Fernández & Parra-Cid 2010).

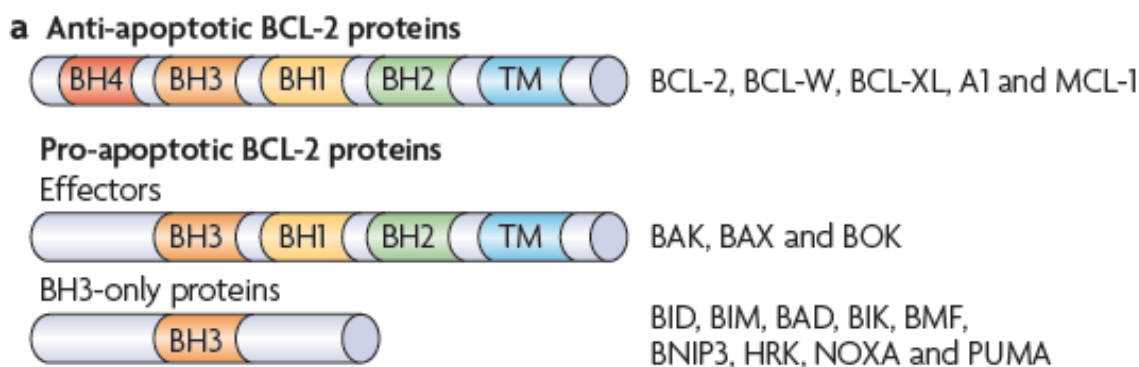
Παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, και απελευθέρωση δύο βασικών ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από το κυτόχρωμα C, τη Smac αλλιώς γνωστή ως Diablo και την πρωτεάση Σερίνης HTRA2, αλλιώς γνωστή ως Omi, οι οποίες ενεργοποιούν το κασπασοεξαρτώμενο μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Το κυτόχρωμα C συνδέεται, παρουσία ATP, με τον παράγοντα Apaf -1 και την προκασπάση-9 και σχηματίζεται ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται αποπτώσωμα (Jin & El-Deiry 2005, Elmore 2007, Tait & Green 2010, Wong 2011). Σε αυτό το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ενεργοποιείται η κασπάση -9, η οποία χαρακτηρίζεται ως εισαγωγικό μόριο (initiator) στην αποπτωτική διαδικασία (Αγγελοπούλου & Κυριαζόγλου 2002). Η κασπάση -9 οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης -3 η οποία λειτουργεί ως εκτελεστής της απόπτωσης (Jin & El-Deiry 2005, Armstrong 2006, Wong 2011). Οι Smac/Diablo και HtrA2/Omi προάγουν την ενεργοποίηση των κασπασών μέσω της δέσμευσής τους στις IAP πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (Wong 2011). Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών AIF και ενδονουκλεάση G (Endo G) (Jin & El-

The diagram illustrates the Extrinsic Apoptosis Pathway. It begins with a Death Receptor on the cell membrane, which recruits FADD and Pro-Caspase-8. This leads to the activation of Caspase-8. Caspase-8 then cleaves Bid into t-Bid. t-Bid, along with Bcl-2/Bcl-XL and Bax, forms a pore in the mitochondrial membrane, allowing Cytochrome c to be released from the mitochondria. Cytochrome c then binds to Pro-Caspase-9, leading to its activation into Caspase-9. Caspase-9 cleaves ICAD/CAD, releasing CAD. CAD then cleaves PARP. Additionally, Caspase-8 cleaves Pro-Caspase-3 into Caspase-3. Caspase-3, along with XIAP, leads to the activation of Caspase-9. Caspase-9 also cleaves Pro-Caspase-3 into Caspase-3. Caspase-3 then cleaves PARP. The diagram also shows the role of Smac/Diablo and Omi/HtrA2 in inhibiting XIAP, and the role of Bcl-2/Bcl-XL and Bax in regulating the mitochondrial pore.

Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων ρυθμίζεται από πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Bcl-2. Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν ένα υδρόφοβο C τελικό άκρο με το οποίο εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη κυρίως των μιτοχονδρίων, ενώ το μεγαλύτερο μέρος βρίσκεται στο κυτταροδιάλυμα (Hengartner 2000). Μια σημαντική βιοχημική ιδιότητα των πρωτεϊνών της Bcl-2 είναι να ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά την διαπερατότητά της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XL εμποδίζουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απελευθέρωση προ αποπτωτικών πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό χώρο και συνεπώς προάγουν την επιβίωση του κυττάρου. Αντίθετα οι πρωτεΐνες Bax

και η Bak προκαλούν διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωσή των πρωτεϊνών αυτών στο κυτταροδιάλυμα. Η ρυθμιστική δράση των πρωτεϊνών της Bcl-2 στη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων οφείλεται στην παρουσία μίας ή περισσότερων διατηρημένων περιοχών με όμοια ακολουθία αμινοξέων γνωστές ως BH ομόλογες περιοχές (Armstrong 2006).

Τα μέλη της υπερικογενείας διμερίζονται. Ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μελών επιτυγχάνεται όταν μία BH3 περιοχή (**Εικόνα 13**) προσδένεται προσδένεται σε μια υδρόφοβη περιοχή που σχηματίζεται από τις περιοχές BH1-BH2-BH4 του άλλου μέλους (Hergatner 2000). Ο λόγος προαποπτωτικών - αντιαποπτωτικών μελών της υπερικογενείας Bcl-2 καθορίζει την κατάληξη των κυττάρων έπειτα από κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα (Wong 2011).



Εικόνα 13: Προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά μέλη της υπερικογενείας Bcl2 των πρωτεϊνών (Πηγή: Tait & Green 2010)

1.2.1.1.1.2 Εξωγενής οδός των υποδοχέων θανάτου

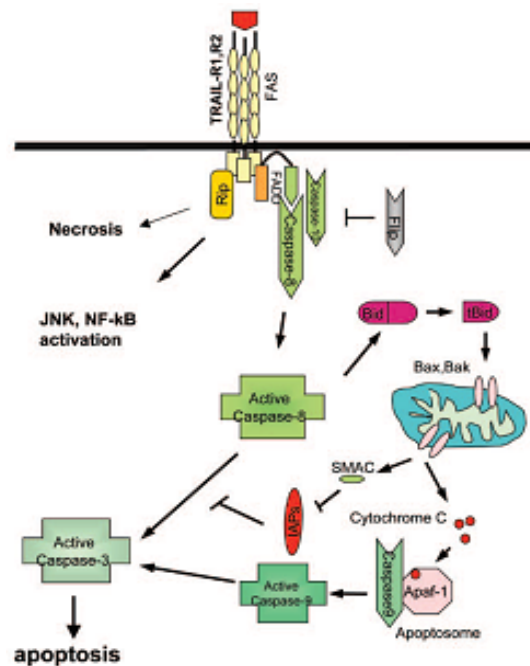
Μεγάλο εύρος εξωκυττάρων σημάτων είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν το εξωγενές μονοπάτι ή μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται όταν κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα συνδεθεί με κάποιον υποδοχέα θανάτου που εδράζεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου (Jin & El-Deiry 2004).

Οι υποδοχείς θανάτου που ενεργοποιούν την απόπτωση των κυττάρων (Fas, TNFR1 και TRAIL) είναι μέλη της υπερικογενείας των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF. Χαρακτηρίζονται από εξωκυττάρια περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Επίσης αποτελούν μια υποομάδα στην υπερικογένεια υποδοχέων TNFR με μία ομόλογη κυττοπλασματική περιοχή 80 αμινοξέων, η οποία ονομάζεται περιοχή θανάτου DD (Death domain) και συμμετέχει

στην απόπτωση (Debatin & Krammer 2004, Elmore 2007). Οι περιοχές θανάτου DD (Death domain) επιτρέπουν στους υποδοχείς να συνδεθούν με μόρια προσαρμοστές (FADD) που επίσης διαθέτουν περιοχές θανάτου και να μεταβιβάσουν το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου (Chinnaiyan et al. 1995, Schulze-Osthoff 2008, Elmore 2007). Ο FADD συνδέεται άμεσα στον υποδοχέα Fas. Με τους υποδοχείς TNFR1 και DR 3 συνδέεται μέσω ενός άλλου προσαρμοστικού μορίου του TRADD.

1.2.1.1.2.1 Σηματοδοτική οδός των υποδοχέων Fas και TRAIL

Ο FADD περιέχει μια περιοχή θανάτου DED που συνδέεται με ανάλογη περιοχή της προ-κασπάσης 8. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας, το προσαρμοστικό μόριο FADD και η προ-κασπάση 8 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών γνωστό ως DISC του Fas. Μέσα στο πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο η προ-κασπάση -8 ενεργοποιείται, αυτοδιασπάται και απελευθερώνεται η κασπάση- 8, η οποία ενεργοποιεί άλλες κασπάσες τελεστές όπως η κασπάση 3,6,7 που οδηγούν το κύτταρο στην απόπτωση. Η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 μπορεί να ανασταλεί από την c Flip (Elmore 2007). Υπάρχουν αναφορές ότι ο ρόλος της c Flip είναι αμφιλεγόμενος (Jin & El-Deiry 2005).



Εικόνα 14: Σηματοδοτικό μονοπάτι των Fas και TRAIL (Πηγή: Jin & El-Deiry 2005)

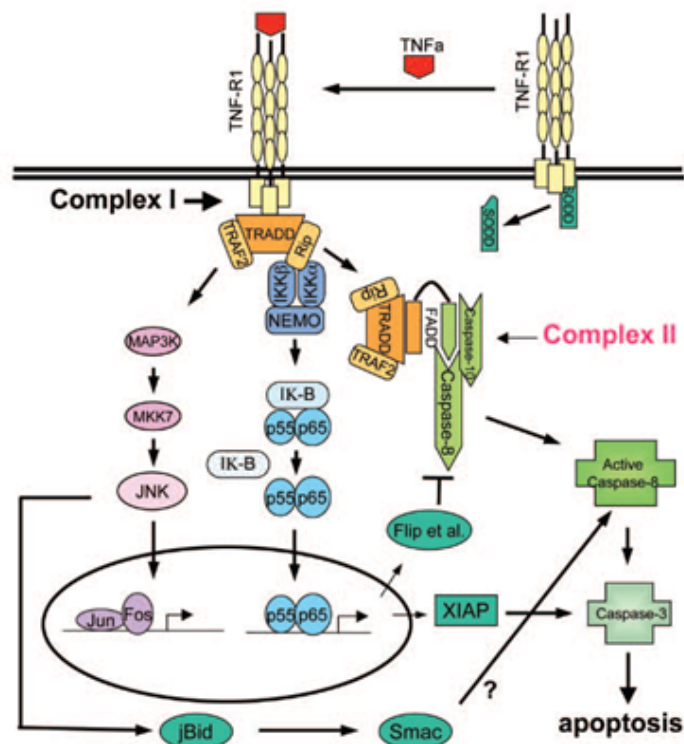
Σε ορισμένο τύπο κυττάρων η κασπάση -8 μεσολαβεί την διαίρεση της Bid (Luo et al. 1998) (προαποπτωτικό μέλος των Bcl2), κάτι που αυξάνει σημαντικά την ενεργότητά της με αποτέλεσμα την μετακίνησή της στα μιτοχόνδρια όπου προκαλεί την έξοδο του προαποπτωτικών παραγόντων,

όπως της SMAC/ Diablo και του κυτοχρώματος C τον σχηματισμό του αποπτοσώματος και την ενεργοποίηση της κασπάσης -3 (**Εικόνα 11**). Παρατηρείται δηλαδή διασταύρωση των δύο αποπτωτικών μονοπατιών (Jin & El-Deiry 2005).

Υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες που συνδέονται στο σύμπλοκο του Fas Disc. Η σύνδεση της κινάσης Rip στο σύμπλοκο του Fas Disc οδηγεί σε νέκρωση. Η σύνδεση Daxx οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της JNK, το οποίο μπορεί να μεσολαβεί την απόπτωση μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού. Η σύνδεση της Fap-1 (φωσφατάση) ρυθμίζει αρνητικά τον Fas. Η σύνδεση της κινάσης Rip στο σύμπλοκο του Fas Disc οδηγεί σε νέκρωση (**Εικόνα 14**) (Jin & El-Deiry 2005).

1.2.1.1.2.2 Σηματοδοτική οδός του υποδοχέα TNFR1.

Στον απενεργοποιημένο υποδοχέα TNFR1 η δεσμευμένη SODD καλύπτει την περιοχή θανάτου DD (**Εικόνα 15**). Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα η SODD απομακρύνεται και το προσαρμοστικό μόριο TRADD συνδέεται στον υποδοχέα μέσω της περιοχής θανάτου DD που διαθέτει. Στο σύμπλοκο αυτό συνδέονται ο παράγοντας TRAF 2 και η κινάση RIP (πρωτεϊνικό σύμπλοκο I)



Εικόνα 15: TNF Σηματοδοτικό μονοπάτι (Πηγή: El-Deiry 2005)

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο I ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-Kb μέσω της αποικοδόμησης του αναστολέα του, της πρωτεΐνης Ikb που τον συγκρατεί στο κιτοσόλιο ή τον JNK. Ο NF-Kb ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων (Jin & El-Deiry 2005, Hofset 2008) που:

- Εμπλέκονται σε φλεγμονές iNOs, COX-2, Cytocines, matrix μεταλοπρωτεΐνάσες
- Αντι-αποπτωτικούς παράγοντες, όπως cFLIP, IEX-1L, Bfl-1/A1, XIAP, cIAP1, cIAP2, and Bcl-XL.
- Γεγονότα που σχετίζονται με τον κύκλο του κυττάρου

Όταν το σύμπλοκο I ενεργοποιεί τον NF-kB η FLIP-L αναστέλλει την κασπάση 8 στο σύμπλοκο II και το κύτταρο επιβιώνει (Jin & El-Deiry 2005).

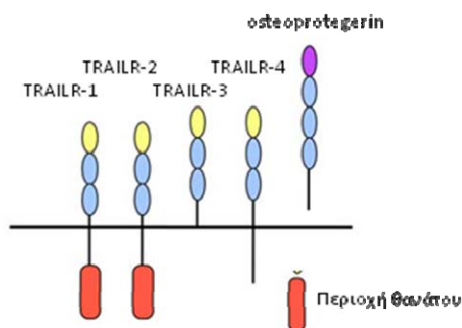
Η ενεργοποίηση του TNFR1 σε κάποια κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, όταν αναστέλλεται η προτεϊνισύνθεση ή όταν μπλοκάρεται η ενεργοποίηση του NF-Kb. Τότε σχηματίζεται το κυτταροπλασματικό σύμπλοκο ή πρωτεϊνικό σύμπλοκο II από τις TRADD και RIP1 που συνδέονται με τον FADD και την κασπάσης-8, ενεργοποιείται η κασπάση -8 και το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση (Jin & El-Deiry 2005).

Ο TNF μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της JNK μέσω του οποίου ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1. Οι AP-1 πρωτεΐνες έχουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, επαγωγή και αναστολή της απόπτωσης. Η αναστολή της απόπτωσης μέσω του μονοπατιού της JNK εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και άλλα μονοπάτια, όπως εκείνο του NF-kb. Αναστολή της απόπτωσης μέσω του μονοπατιού της JNK προάγει τη νέκρωση μέσω αύξησης της παραγωγής δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) (Jin & El-Deiry 2005).

1.2.1.1.2.3 Σηματοδοτική οδός του υποδοχέα TRAIL

Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς TRAIL σηματοδοτούν την απόπτωση των κυττάρων και την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NF-kb και του JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) (Baetu & Hiscott 2002, Kimberley & Screaton 2004). Αρχικά παρατηρήθηκε, ότι η ενεργοποίηση του TRAIL οδηγεί σε απόπτωση τα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι όμως τα φυσιολογικά (Kimberley & Screaton 2004). Αργότερα διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν πέντε υποδοχείς TRAIL (**Εικόνα 16**), οι οποίοι διακρίνονται ανάλογα με το αν διαθέτουν λειτουργική περιοχή θανάτου (DD) σε εκείνους που ενεργοποιούν ή όχι την απόπτωση των κυττάρων. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι υποδοχείς TRAIL-R1/DR4 και TRAIL-R2/DR5, οι οποίοι διαθέτουν περιοχή θανάτου DD και σηματοδοτούν την απόπτωση, ενώ η ομάδα των TRAIL-R3/DR1, TRAIL-R4/DR2 δε διαθέτουν αντίστοιχη λειτουργική περιοχή (Baetu & Hiscott 2002, Pennarun et al. 2010, Kimberley & Screaton 2004) και συνεπώς δεν

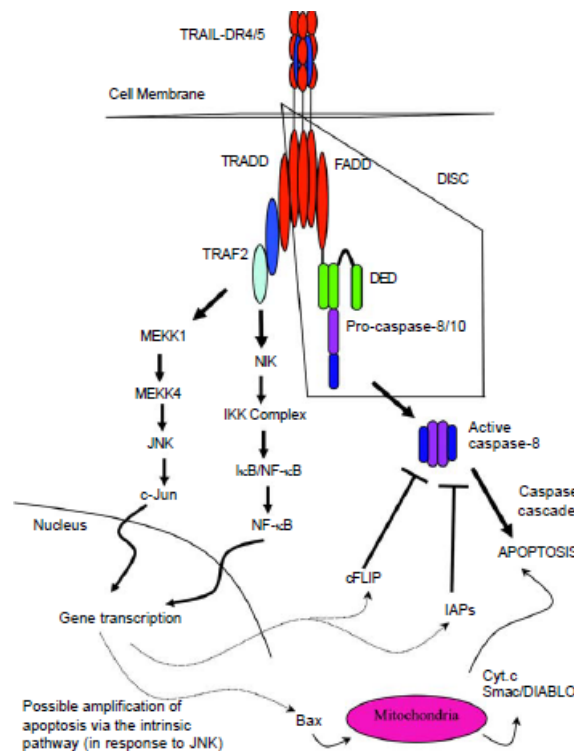
έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν το αποπτωτικό μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου. Ο υποδοχέας της Οστεοπροτεγερίνης (OPG) είναι ένας διαλυτός εκκρινόμενος TRAIL υποδοχέας. Η επιλεκτικότητα του υποδοχέα TRAIL στα καρκινικά κύτταρα θεωρήθηκε ότι οφείλονταν στην έκφραση των υποδοχέων με λειτουργικές περιοχές θανάτου στα καρκινικά κύτταρα και των TRAIL-R3/DR1, TRAIL-R4/DR2 στα φυσιολογικά κύτταρα



Εικόνα 16: Τροποποιημένη σχηματική παράσταση των πέντε υποδοχέων TRAIL, (Πηγή: Kimberley & Screaton 2004).

Έχει διαπιστωθεί, ότι σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές εκφράζονται κατά προτίμηση, εκτός των άλλων, οι υποδοχείς TRAIL - R1 και TRAIL-R2. Στο γεγονός αυτό φαίνεται να οφείλεται η μερικός επιλεκτική ενεργοποίηση της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα κυτταρικών σειρών (Baetu & Hiscott 2002, Kimberley& Screaton 2004, Mérimo et al. 2006, Pennarun et al. 2010). Οι υποδοχείς TRAIL που διαθέτουν μη λειτουργικές περιοχές θανάτου (TRAIL-R3/DR1, TRAIL-R4/DR2) πιστεύεται ότι είναι δυνατό να σχηματίσουν σύμπλοκο με τους υποδοχείς TRAIL-R1 και / ή TRAIL-R2, κάτι που οδηγεί σε μη αποτελεσματικό σχηματισμό του DISC και συνεπώς σε αποτροπή της απόπτωσης των κυττάρων (Kimberley& Screaton 2004, Mérimo et al. 2006, Pennarun et al. 2010). Το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι των TRAIL-R1/DR4 και TRAIL-R2/DR5 είναι η ενεργοποίηση της απόπτωσης (**Εικόνα 17**). Η μερική ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NP-κΒ και c-Jun μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση αντι-αποπτοτικών γονιδίων κάτι που προάγει την επιβίωση του κυττάρου ή να ενισχύσει το αποπτωτικό σήμα μέσω της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στο εγγενές (μιτοχονδριακό) σηματοδοτικό αποπτωτικό μονοπάτι. Το αποπτωτικό μονοπάτι είναι όμοιο με εκείνο που επάγεται από τον Fas.

Οι ενεργοποιητές του TRAIL παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως αντικαρκινικοί παράγοντες λόγω της επιλεκτικής τους δράσης στα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του Σηματοδοτικού αποπτωτικού μονοπατιού που επάγεται από τον TRAIL (Πηγή: Kimberley & Screaton 2004).

1.2.1.1.1.3 Ενδογενής σηματοδοτική οδός του ενδοπλασματικού δικτύου

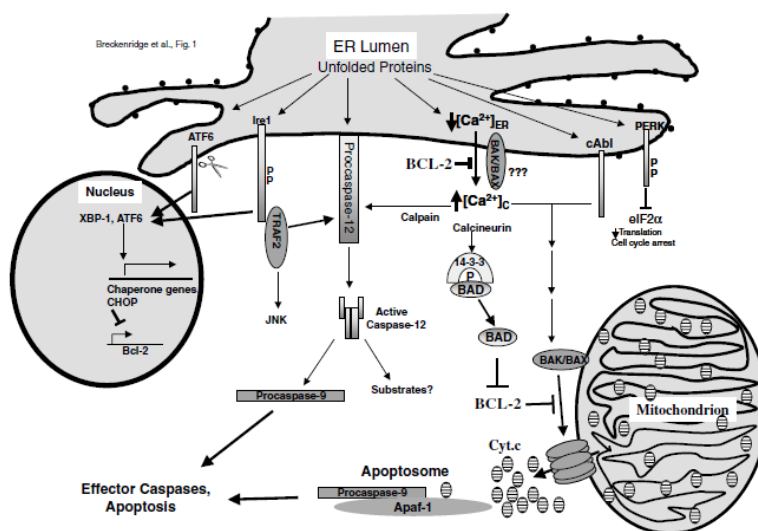
Το ενδογενές μονοπάτι του ενδοπλασματικού δικτύου είναι το τρίτο και λιγότερο γνωστό σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης (Wong 2011). Το ενδοπλασματικό δίκτυο λειτουργεί ως ενδοκυττάρια αποθήκη ασβεστίου, είναι ο χώρος όπου οι πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση συντίθενται, διπλώνονται, τροποποιούνται και παραδίδονται στον τελικό τους προορισμό και το μέρος που συντίθενται τα λιπίδια (Szegezdi et al. 2003). Διάφοροι παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, η έκθεση σε αναστολείς της γλυκοζυλίωσης, η θεραπεία με ιονοφόρα Ca^{2+} , η τοξικότητα από χημικά (Rao 2004, Jin & El-Deiry 2005), η έκφραση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και η απελευθέρωση ασβεστίου από τον αυλό του ΕΔ, διαταράσσουν την ορθή λειτουργία του ΕΡ και να προκαλούν το λεγόμενο “στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Shiraishi et al. 2006), το οποίο οδηγεί σε παρεμπόδιση της ορθής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού απόκρισης που ονομάζεται «απόκριση των μη ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών - unfolded protein response - UPR». Οι πρωτεΐνες που δεν διπλώνονται ή δεν συναρμολογούνται σωστά συκρατούνται ενεργά στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή αποικοδομούνται (Alberts et al. 2000) μέσω του συμπλέγματος ERAD (Shiraishi et al. 2006). Η μεταγραφή περιορίζεται για να αποτραπεί η περεταίρω συσσώρευση

και ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνοδούς του ενδοπλασματικού δικτύου (chaperons) με στόχο την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσής. Αυτή η συντονισμένη και πολύπλοκη κυτταρική απόκριση μεσολαβείται από 3 διαμεμβρανικούς υποδοχείς του ενδοπλασματικού δικτύου, ATF6, IRE1 και PERK (Shiraishi et al. 2006). Η ικανότητα των κυττάρων να αποκρίνονται σε διαταραχές της λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου, είναι κρίσιμης σημασίας για την επιβίωση των κυττάρων (Tabas & Ron 2011). Αν για οποιοδήποτε λόγο, ο μηχανισμός που ενεργοποιείται για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ενδοπλασματικού δικτύου αποτύχει, τότε το στρες επάγει τον κυτταρικό θάνατο (Jin & El-Deiry 2005) και το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση (Tabas & Ron 2011). Σύμφωνα με πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα από το ενδοπλασματικό δίκτυο ενεργοποιούνται πορείες μεταγωγής σήματος που οδηγούν σε απόπτωση **(Εικόνα 8)**, είτε άμεσα μέσω ενεργοποίησης των κασπασών (Wong 2011), είτε έμμεσα μέσω ευαισθητοποίησης των μιτοχονδρίων σε αποπτωτικούς παράγοντες **(Εικόνα 18)** (Breckenridge et al. 2003, Jin & El-Deiry 2005, Shiraishi et al. 2006).

Σύμφωνα με τους Nakagawa et al. (2000) το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που σχετίζεται με τη συσσώρευση της περίσσειας των πρωτεϊνών ή την απώλεια της ομοιοστασίας ασβεστίου ενεργοποιεί την κασπάση-12 που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ενεργοποιημένη κασπάση-12 μετατοπίζεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτοσόλιο, διασπά την προκασπάση -9 και ενεργοποιεί την κασπάση -9 ανεξάρτητα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και το σχηματισμό αποπτοσώματος. Η κασπάση -9 ενεργοποιεί στη συνέχεια την κασπάση -3 (Morishima et al. 2002, Breckenridge et al. 2003).

Η απελευθέρωση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτοσόλιο συνοδεύεται συχνά από πρόσληψη Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια. Στην επαγόμενη από κεραμίδιο και σταυτοσπορίνη απόπτωση το Ca^{2+} δρα ως διαμεσολαβητής μεταξύ μιτοχονδρίων και ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση των κασπασών που οδηγούν σε απόπτωση (Breckenridge et al. 2003, Jin & El-Deiry 2005). Μέλη της οικογένειας Bcl-2 που εδράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι δυνατό είτε να διακόψουν την επικοινωνία μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων και να προάγουν την επιβίωση του κυττάρου είτε να ενεργοποιήσουν την αποπτωτική διαδικασία με τη δράση τους τόσο στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όσο και στα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με τους Zong et al. (2003) τα προαποπτωτικά μέλη Bax και Bak εντοπίζονται εκτός από την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου λειτουργούν και ενεργοποιούν παράλληλα κασπασοεξαρτώμενα αποπτωτικά μονοπάτια. Η

Bak στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλεί ελάττωση του Ca^{2+} και επαγωγή της κασπάσης -12, ενώ στα μιτοχόνδρια προκαλεί αύξηση της κασπάσης-7 και διάσπαση της PARP.



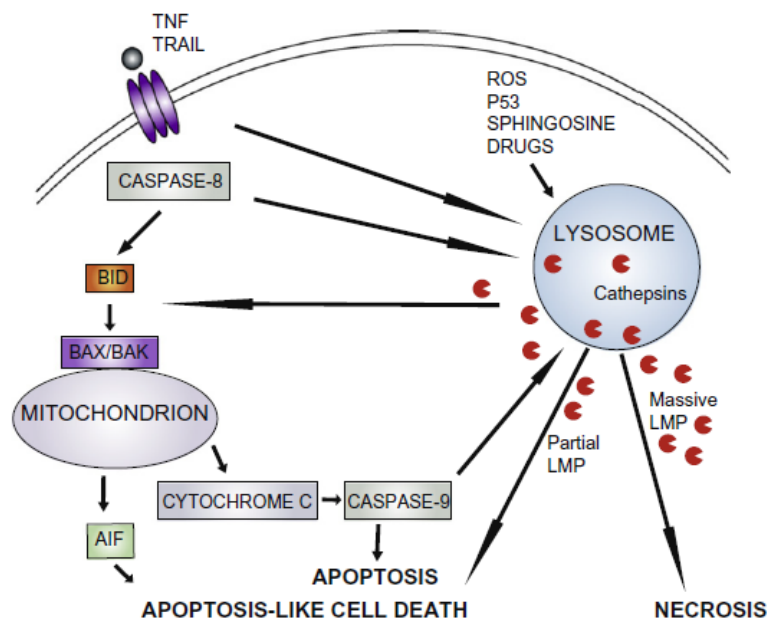
Εικόνα 18: Σηματοδοτικά αποπτωτικά μονοπάτια του ενδοπλασματικού δικτύου (Πηγή: Breckenridge et al. 2003)

1.2.1.1.1.4 Σηματοδοτική οδός λυσοσωμάτων

Τα λυσοσώματα είναι εξειδικευμένα μεμβρανικά οργανίδια πλούσια σε υδρολυτικά ένζυμα που δρουν σε όξινο PH. Η λειτουργία τους σαν ενδοκυττάριο σύστημα πέψης περιλαμβάνει την αποδόμηση του υλικού που προσλαμβάνεται από το κύτταρο, ορισμένων γερασμένων κυτταρικών στοιχείων (Stevens & Lowe 1993) και πρωτεϊνών. Ο ρόλος τους στην απομάκρυνση παθογόνων, την επισκευή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την ανακύκλωση επιφανειακών υποδοχέων είναι σημαντικός. Το υλικό που πρόκειται να αποδομηθεί εισέρχεται στα λυσοσώματα με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, της φαγοκυττάρωσης ή της αυτοφαγίας (Turk & Turk 2009, Groth-Pedersen & Jäättelä 2013).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα τα λυσοσώματα παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της απόπτωσης (Jäättelä et al. 2004, Ivanova et al. 2008, Repnik & Turk 2010) των καρκινικών κυττάρων (Guicciardi et al. 2004, Tardy et al. 2006, Turk & Turk 2009) και παρουσιάζουν ενδιαφέρον στο πεδίο της ογκολογίας (Kirkegaard & Jäättelä 2009). Αποσταθεροποίηση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων μπορεί να προκληθεί από διάφορα αίτια, όπως από λυσοσωμοτροπικά συστατικά, από χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 , από οξειδωτικό στρες κλπ.. Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η κατάρρευση της μεμβράνης των λυσοσωμάτων δεν έχει πλήρως διεκρινιστεί (Conus & Simon 2008, Repnik & Turk 2010). Έχει προταθεί πως χαμηλά επίπεδα στρες

προκαλούν μερική αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των λυσοσωμάτων, περιορισμένη απελευθέρωση του περιεχομένου τους στο κυτταρόπλασμα, η οποία ακολουθείται από απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο που μοιάζει με αποπτωτικό (Εικόνα 8) (Conus & Simon 2008, Kirkegaard & Jäättelä 2009, Repnik & Turk 2010, Groth-Pedersen & Jäättelä 2013). Αντίθετα αυξημένα επίπεδα στρες οδηγούν σε ρήξη της μεμβράνης και ταχεία νέκρωση των κυττάρων (Groth-Pedersen & Jäättelä 2013, Repnik & Turk 2010). Οι καθεψίνες που απελευθερώνονται από τα λυσοσώματα στο κυτοσόλιο έχουν τη δυνατότητα να αυξήσουν την διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων μέσω της ενεργοποίησης του προ-αποπτωτικού μέλους Bid της υπερικογένειας Bcl-2. Η Bid στη συνέχεια ενεργοποιεί τη Bax και /ή την Bak που ενεργοποιούν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης (Conus & Simon 2008, Kirkegaard & Jäättelä 2009, Groth-Pedersen & Jäättelä 2013). Ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (TNF- α , Fas, TRAIL), επίσης επάγουν την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των λυσοσωμάτων, την απελευθέρωση καθεψινών και τη διάσπαση της Bid που μεσολαβεί τη διασταύρωση του εξωγενούς και του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού (Εικόνα 19) (Conus & Simon 2008, Kirkegaard & Jäättelä 2009).



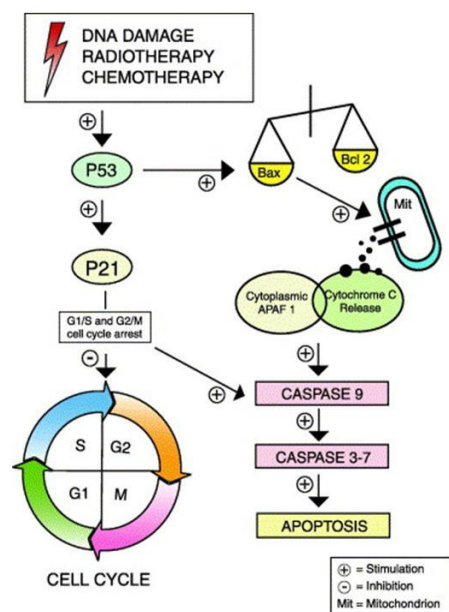
Εικόνα 19: Μονοπάτια κυτταρικού θανάτου που επάγονται από τα λυσοσώματα (πηγή: Groth-Pedersen & Jäättelä 2013)

Παρόλο που οι καθεψίνες όταν απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα διαμεσολαβούν τον κυτταρικό θάνατο, η απελευθέρωσή τους στο εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωκυττάρωσης προάγει την

διείσδυση και την αγγειογένεση. Η εξωκυττάρωση από τα λυσοσώματα σχετίζεται και με την ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα, τα οποία εξωκυτταρώνονται μετά την απομόνωσή τους στα λυσοσώματα. Παρόλα αυτά σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα η επαγωγή της διαπερατότητας της μεμβράνης των λυσοσωμάτων παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη θανάτωση ανθεκτικών στην απόπτωση καρκινικών κυττάρων (Kirkegaard & Jäättelä 2009) και την ευαισθητοποίηση ανθεκτικών κυττάρων σε κλασικές χημειοθεραπευτικές ουσίες (Groth-Pedersen & Jäättelä 2013).

1.2.1.1.1.5 Πρωτεΐνη p53 και ο ρόλος της στην απόπτωση

Η αρνητική ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 οδηγεί σε αύξηση της ανάπτυξης των όγκων, είτε λόγω μειωμένης απόπτωσης (Wong 2011) είτε λόγω της ανθεκτικότητας σε κυτταροτοξικές θεραπείες (Hale et al. 1996). Το λειτουργικό προϊόν του γονιδίου p53 είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανιχνεύει βλάβες στο DNA που μπορεί να προκληθούν από ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες (Amundson 1998), εμποδίζει το κύτταρο να εισέλθει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου παρέχοντας αρκετό χρόνο για να πραγματοποιηθεί η διόρθωση του DNA ενεργοποιεί τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 (Norbury & Zhivotovsky 2004, Amaral 2010), όπως τα Puma, Noxa, Bim, Bid, Bik, Bak, Bax, Apaf-1, Bmf, Hrk, Pag608, Drs, (Rastogi-Richa & Sinha 2009) και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής της μεσολαβούμενης από την p 53 σηματοδοτικής οδού της απόπτωσης (Gillham et al. 2007)

Σε περίπτωση που το γονίδιο p 53 δεν μεταγράφεται, ή αν η πρωτεΐνη p53 είναι ελαττωματική, τότε η απρόσκοπτη αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA συνοδεύεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων, με συνέπεια να παράγονται κύτταρα με προδιάθεση να γίνουν καρκινικά (Alberts et al. 2000). Στο 50 % των ανθρώπινων καρκίνων έχει διαπιστωθεί βλάβη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη (Wu et al. 2001, Wong 2011). Η καταστολή της έκφρασης του μεταλλαγμένου p53 επάγει την απόπτωση και οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη της κυτταρικής αποικίας σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (Wong 2011). Συνεπώς καταστολή της μεταλλαγμένης p53 ή η επαγωγή του άγριου τύπου της p53 είναι δυνατό να ενεργοποιήσουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

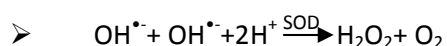
1.2.1.1.1.6 Παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και απόπτωση

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις οι οποίες καλούνται στο σύνολό τους δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ)(reactive oxygen species, ROS) αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού (Matés 2009) σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους μπορεί να έχουν ωφέλιμη ή επιβλαβή επίδραση στα κύτταρα και τους ιστούς (Circu & Aw 2010, Bolt et al. 2009).

Οι ΔΜΟ, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η δραστική ρίζα του υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) προκαλούν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη, υπεροξειδωση των λιπιδίων και μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις στο DNA και τις πρωτεΐνες (Higuchi 2003). Συνθήκες που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ ή ελαττωμένη απομάκρυνσή τους από τα κύτταρα οδηγούν σε συσσώρευση τους, μία κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες (Barbouti 2009). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι ΔΜΟ δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και έχουν προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό. Ο σχηματισμός τους είναι απαραίτητος για την φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών, τις αντιδράσεις αποτοξικοποίησης από το κυττόχρωμα P-450, την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης σε καρκινικά ή άλλα επιβλαβή για τον οργανισμό κύτταρα (Salganik 2001). Για να προστατευθεί από την υπεροξειδωση το κύτταρο παράγει αντιοξειδωτικά (Bandyopadhyay 1999) ένζυμα και αντιοξειδωτικές μικρού μοριακού βάρους ενώσεις και βιταμίνες (Βαλαβανίδης 2003). Αύξηση της συγκέντρωσης των ΔΜΟ λόγω ελάττωσης των αντιοξειδωτικών ενισχύει την απόπτωση (Matés & Sánchez-Jiménez 2000, Fleury et al. 2002) και καταστέλλει την ανάπτυξη των όγκων. Υπερβολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μειώνει τα

επίπεδα των ΔΜΟ αναστέλλει την απόπτωση και τη δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων (Salganik 2001).

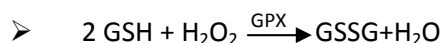
Αύξηση των ΔΜΟ μπορεί να σημειωθεί λόγω αναστολής της δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD). Το ένζυμο είναι απαραίτητο για την μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) σε υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H_2O_2) και O_2 και την προστασία των κυττάρων από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες του Οξυγόνου. Αναστολή του ενζύμου προκαλεί ενδοκυττάρια συσσώρευση $O_2^{\bullet-}$ και οδηγεί στην καταστροφή των μεμβρανών των μιτοχονδρίων από ελεύθερες ρίζες, απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων Reddy et al. 2004).



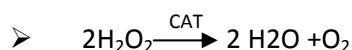
Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι πιο σταθερή ένωση συγκριτικά με το $O_2^{\bullet-}$. Λόγω έλλειψης φορτίου μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες. Συσσώρευση H_2O_2 μπορεί να είναι πολύ επικίνδυνη για τα κύτταρα γιατί παρουσία ιόντων Fe (+2) ή Cu(+2) (Αντίδραση Fenton) οδηγεί στην παραγωγή πολύ ενεργής υδροξυλικής ρίζας (Matés & Sánchez-Jiménez 2000). Μπορεί να οξειδώσει όλες τις οργανικές ενώσεις που βρίσκονται κοντά της και να προκαλέσει μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις σε νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες και οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα την καταστροφή της ακεραιότητας των μεμβρανών.



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH) είναι ένα από τα ένζυμα που απομακρύνει το H_2O_2 από τα κύτταρα. Η GSH περιέχεται στα περισσότερα κύτταρα των θηλαστικών σε υψηλές συγκεντρώσεις (>4 mM) κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (>90%). Ενδοκυττάρια μείωση των επιπέδων της GSH ενεργοποιεί την απόπτωση (Ghibelli et al. 1999) μέσω της μεσολάβησης των ΔΜΟ (Higuchi 2003, Circu & Aw 2010) .

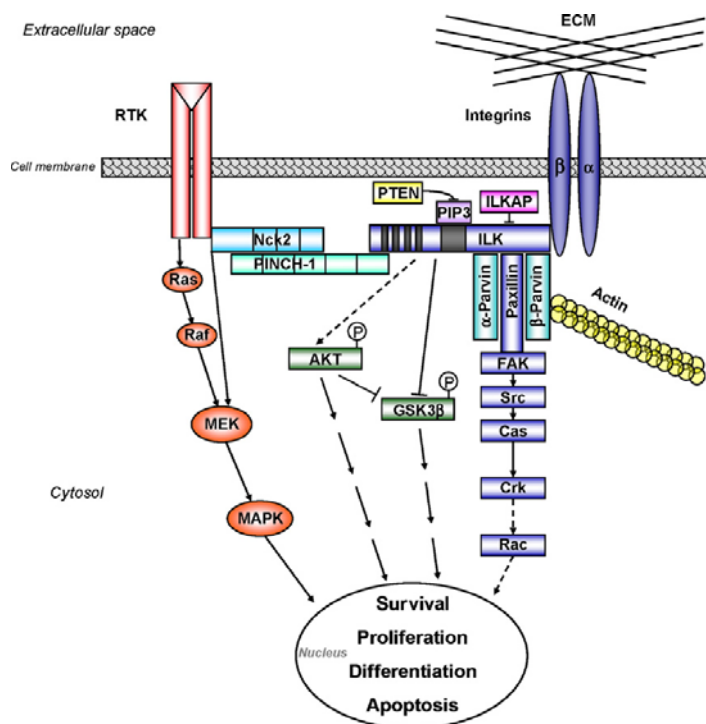


Η καταλάση (CAT) είναι ένα ένζυμο που εξουδετερώνει το H_2O_2 και σχηματίζεται νερό και μοριακό οξυγόνο.



1.2.1.2 Anoikis

Ένας ιδιαίτερος τύπος απόπτωσης που παρατηρείται στα επιθήλια, είναι γνωστός στη διεθνή βιβλιογραφία ως Anoikis (Frisch & Francis 1994, Gilmore 2005, Taddei et al. 2012). Ο όρος αυτός, ο οποίος προέρχεται από την ελληνική λέξη αν-οίκ-ις και σημαίνει “χωρίς σπίτι”, χρησιμοποιήθηκε από τους Frisch & Francis (1994) για να περιγράψουν την ενεργοποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), σε αποκολλημένα κύτταρα από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ο μηχανισμός αυτός, ο οποίος αποτρέπει την επιβίωση, εγκατάσταση και αποίκηση των αποκολλημένων επιθηλιακών κυττάρων σε κάποιο άλλο σημείο, είναι σημαντικός για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών.

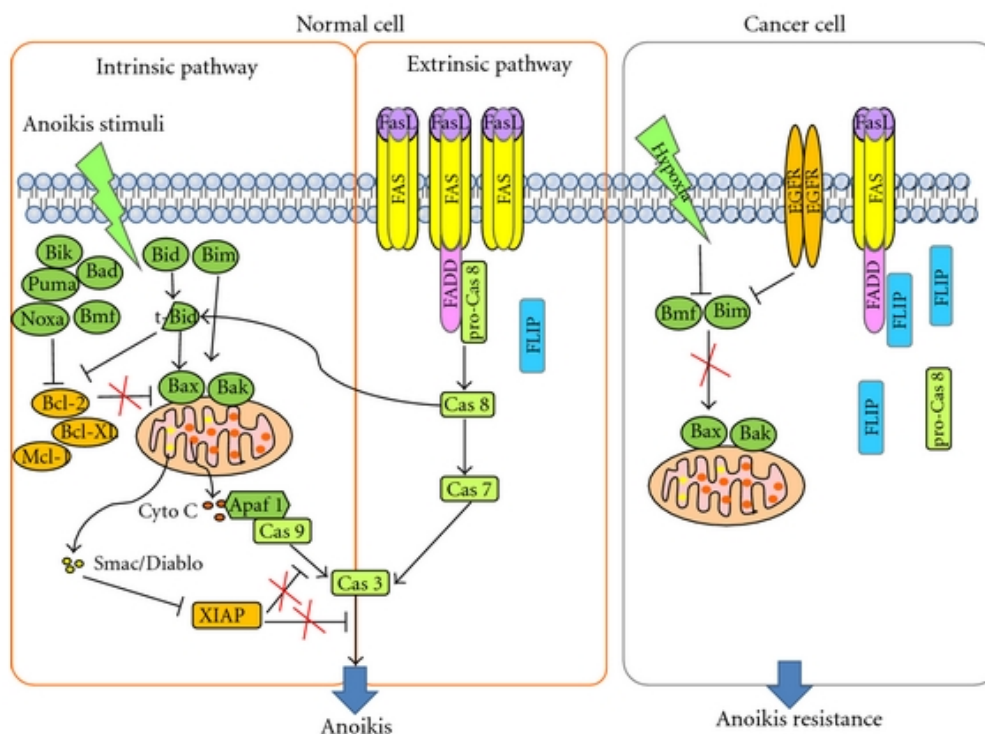


Εικόνα 21: Το δίκτυο ιντεργκρίνης- ακτίνης-RTK (Πηγή: Hehlhans et al. 2006).

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που μεσολαβούν την προσκόλληση του κυττάρου στους ιστούς που το περιβάλλουν. Συνδέουν τα ενδοκυττάρια νημάτια της ακτίνης με πρωτεΐνες του εξωκυττάρου στρώματος (Alberts et al. 2000). Το εξωκυττάριο τμήμα απαρτίζεται από δύο διαφορετικές υπομονάδες, την α-υπομονάδα και μια μικρότερη β-υπομονάδα, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό δεσμού με τον υποκατάστατη τους. Μέχρι σήμερα είναι γνωστές 16 α- και 8 β- υπομονάδες ιντεγκρινών, με 25 συνδυασμούς, που καθορίζουν την εκλεκτικότητα τους (Van Nimwegen & Van de Water 2007). Η εκλεκτικότητα της προσκόλλησης αποτρέπει τη χαοτική

ανάμειξη των διαφορετικών ειδών των κυττάρων ενός ιστού (Τζωρτζάτου Σταθοπούλου 2007). Το τελικό τμήμα της ιντεγκρίνης που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο έχει θέσεις δέσμησης διαφόρων μορίων όπως τα FAK, ILK, PINCH Nck2 (Hehlhans et al. 2006) και δρα σαν μεταγωγέας σήματος. Μέσω αυτών των μορίων το σηματοδοτικό μονοπάτι ιντεγκρίνης συνεργάζεται και αλληλεπιδρά με το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και ρυθμίζουν από κοινού την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, το σχήμα των κυττάρων, την πρόσφυση, την μετανάστευση και τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων (**Εικόνα 21**) (Hehlhans et al. 2006).

Έχει διαπιστωθεί, ότι η έναρξη του Ανοίκις οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενδογενούς ή εξωγενούς σηματοδοτικού μονοπατιού της απόπτωσης (**Εικόνα 11**), την ενεργοποίηση των κασπασών και τον κατακερματισμό του DNA. Στην αποπτωτική διαδικασία συμμετέχουν τόσο αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-XL) και όσο και τα προ-αποπτωτικά μέλη (Bax, Bak and Bok ή Bid, Bik, Bmf, Noxa, Bad, Bim and Puma) της υπερικογένειας Bcl-2 των πρωτεϊνών (Taddei et al. 2012).



Εικόνα 22: Σηματοδοτικά μονοπάτια ανοίκις σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.(Πηγή: Kim et al. 2012).

Η έκφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων καθιστά τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στο Ανοίκις (Frisch & Screaton 2001) (**Εικόνα 22**), σε αντίθεση με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα

ανθεκτικά στο Ανοίκis καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν μετά την απόσπασή τους από τις αρχικές θέσεις, μεταναστεύσουν μέσω του αγγειακού συστήματος και μπορούν να προσκολληθούν σε απομακρυσμένες θέσεις στόχους, να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν μεταστάσεις (Kim et al. 2012). Η ανθεκτικότητα στο Ανοίκis μπορεί να σχετίζεται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια της Ιντεγκρίνης, τα μονοπάτια των υποδοχέων θανάτου, τον κυτταροσκελετό, την υπερέκφραση των ογκογονιδίων *ras*, *rac*, *src*, την πρωτεΐνη p53 και την αναστολή του κατασταλτικού γονιδίου PTEN.

1.2.1.3 Νέκρωση

Η νέκρωση ορίζεται ως μια μορφή κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζεται από διόγκωση του κυττάρου (Oncosis), σχηματισμό κυταροπλασματικών κενотоπίων, διόγκωση του ενδοπλασματικού δικτύου και λύση της κυτταρικής μεμβράνης (Rastogi Richa & Sinha 2009). Το περιεχόμενο του κυττάρου εκχύνεται στα γύρω υγιή κύτταρα, γεγονός που οδηγεί σε οξεία φλεγμονώδη απόκριση. Σε ορισμένες παθολογικές συνθήκες, όπως ο καρκίνος και η μόλυνση, η φλεγμονώδης απόκριση που προκαλείται από νέκρωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης (Proskuryakov et al. 2003).

Η νέκρωση συνήθως αναφέρεται ως μία παθητική διαδικασία, η οποία σε αντίθεση με την απόπτωση δεν απαιτεί ενέργεια. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι δεν αποτελεί μία ομοιογενή κατηγορία. Εκτός από παθητική μπορεί να είναι ενεργός προγραμματισμένη και αυστηρώς ρυθμιζόμενη διαδικασία (Proskuryakov et al. 2003, Kitanaka & Kuchino 1999, Kroemer et al. 2009), η οποία περιλαμβάνει (Golstein & Kroemer 2007):

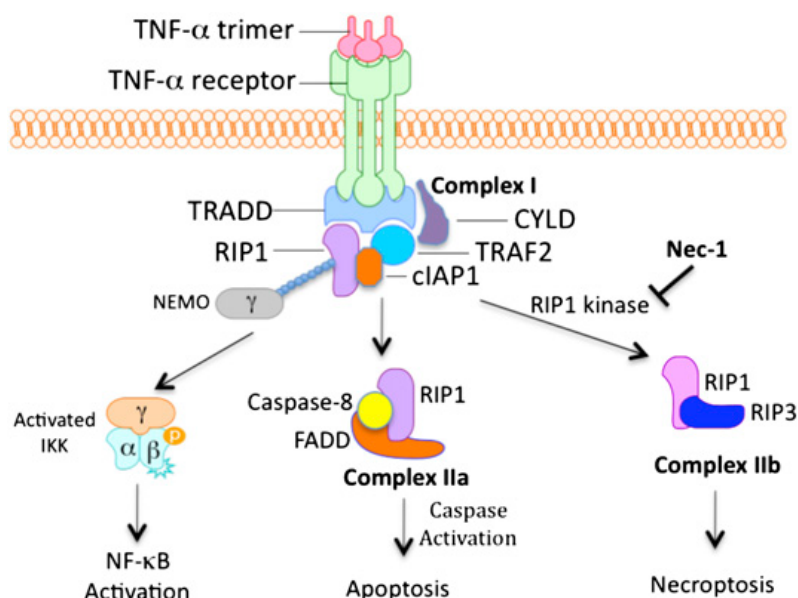
- Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων
- Αυξημένη παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου
- Εξάντληση της ενέργειας του κυττάρου (ATP)
- Πρωτεόλυση από καλπαΐνες και καθεψίνες και
- Πρώιμη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης.

Ορισμένοι ερευνητές για να διαχωρίσουν την προγραμματισμένη νέκρωση από την παθητική έχουν προτείνει τον όρο νεκρόπτωση (Necroptosis) (Kroemer et al. 2009, Nikolettou et al. 2013, Yuan & Kroemer 2013). Έχει διαπιστωθεί, ότι το ίδιο ερέθισμα που ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης μέσω των υποδοχέων θανάτου (TNFR1, Fas, TRAIL-R), μπορεί να ενεργοποιήσει την προγραμματισμένη κυτταρική νέκρωση στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό. Ο κυτταρικός θάνατος, δηλαδή που ενεργοποιείται μέσω των υποδοχέων θανάτου μπορεί να

εκτελεστεί με δύο εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια θανάτου (Yuan & Kroemer 2010, Nikolettou et al. 2013). Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο (1.2.1.1.1.3), ο TNFR1 επάγει το σχηματισμό δύο πρωτεϊνικών συμπλόκων, σύμπλοκο I και σύμπλοκο II, που οδηγούν είτε σε ενεργοποίηση του NF-κB, είτε σε απόπτωση αντίστοιχα. Στην περίπτωση που η απόπτωση δεν μπορεί να ολοκληρωθεί λόγω συνθηκών (παρουσία αναστολέων της κασπάσης-8) σχηματίζεται το πρωτεϊνικό σύμπλοκο IIb στο σχηματισμό του οποίου συμμετέχει επιπρόσθετα η RIP3 και οδηγεί το κύτταρο σε προγραμματισμένη νέκρωση (**Εικόνα 23**) (Yuan & Kroemer 2010, Nikolettou et al. 2013).

Εκτός από τα σηματοδοτικά μονοπάτια υποδοχών θανάτου, καταράκτες κινασών και μιτοχόνδρια που συμμετέχουν, τόσο στη διαδικασία της απόπτωσης, όσο και σε εκείνη της νέκρωσης είναι δυνατό, κάτω από δεδομένες συνθήκες, να ενεργοποιηθούν, είτε τη μία είτε την άλλη διαδικασία (Proskuryakov et al. 2003). Αναστολή των κασπασών μπορεί μερικές φορές να τρέψει την αποπτωτική μορφολογία σε νεκρωτική (Kitanaka & Kuchino 1999).

Επειδή τα καρκινικά κύτταρα είναι συχνά ανθεκτικά στην απόπτωση, ένα εναλλακτικό πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου μπορεί να αποτελεί έναν ελπιδοφόρο θεραπευτικό στόχο συμπληρωματικό της θεραπείας που βασίζεται σε απόπτωση (Kitanaka & Kuchino 1999).



Εικόνα 23: Πρωτεϊνικά σύμπλοκα που επάγονται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου TNFα και μεσολαβούν την ενεργοποίηση του NF-κB της απόπτωσης και της προγραμματισμένης νέκρωσης (necroptosis), (Πηγή : Yuan & Kroemer 2010).

1.2.1.4 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός αυτοαποδόμησης (αυτο-κανιβαλισμός) που περιλαμβάνει την εγκόλπωση κυτταροπλασματικού υλικού και ενδοκυτταρικών οργανιδίων εντός κυστιδίων διπλής μεμβράνης που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα. Το αυτοφαγόσωμα συντήκεται με ένα λυσοσώμα και σχηματίζεται ένα αυτοφαγολυσόσωμα, όπου το εγκλωβισμένο υλικό αποδομείται από ειδικές υδρολάσες (Nikolietoroulou et al. 2013, Kroemer et al. 2009). Η αυτοφαγία με την ανακύκλωση των ελαττωματικών κυτταροπλασματικών συστατικών προάγει την επιβίωση του κυττάρου. Τα νεοπλασματικά κύτταρα επιβιώνουν με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας σε δυσμενείς μικρο-περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο υπέρμετρη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή, αντί επιβίωσης, των νεοπλασματικών κυττάρων.

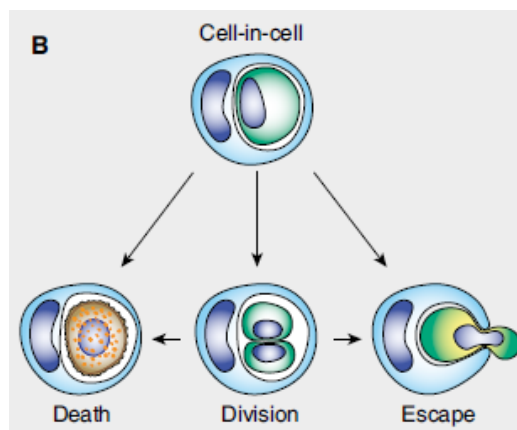
1.2.1.5 Κυτταρικός κανιβαλισμός

Ως κυτταρικός κανιβαλισμός ορίζεται η ικανότητα ενός κυττάρου να φαγοκυτταρώσει ένα άλλο (Yang & Li 2012). Ένα μεγάλο κύτταρο περικλείει ένα λίγο μικρότερο στο κυτταρόπλασμά του (Sharma & Dey 2010). Το εισερχόμενο κύτταρο περιέχεται σε ένα μεγάλο κενοτόπιο το οποίο απωθεί τον πυρήνα του κανίβαλου στην περιφέρεια του κυττάρου (Yang & Li 2012, Sharma & Dey 2010). Στον άνθρωπο το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί μόνο σε ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα όγκων (Fais 2007). Σε εργαστηριακές συνθήκες το φαινόμενο του κανιβαλισμού δεν παρατηρείται σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό (serum – free) (Brouwer et al. 1984). Δεν υπάρχει ακόμα αρκετή πληροφορία σχετικά με το ρόλο του κυτταρικού κανιβαλισμού και του μηχανισμού που υπόκειται του φαινομένου (Sharma & Dey 2010, Lugini et al. 2006). Μέχρι πρόσφατα ήταν γνωστό ότι ο κανιβαλισμός αφορούσε γειτονικά καρκινικά κύτταρα. Έχει όμως αναφερθεί ότι το καρκινικό κύτταρο κανίβαλος μπορεί να εγκολπώσει και άλλα είδη κυττάρων όπως ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, ερυθροκύτταρα (Sharma & Dey 2010, Yang & Li 2012). Τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Τα μεταστατικά κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιούν το φαινόμενο του κανιβαλισμού για να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Sharma & Dey 2010). Τα κανιβαλικά κύτταρα είναι ανθεκτικά σε χαμηλό pH σε αντίθεση με άλλα καρκινικά κύτταρα και τα μακροφάγα. Μία άλλη υπόθεση είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν μέσω του κανιβαλισμού στις αντίξοες συνθήκες που δημιουργούνται λόγω της χαμηλής παροχής αίματος και θρεπτικών συστατικών σε στερεούς όγκους (Yang & Li 2012).

Ο κανιβαλισμός αναφέρεται ως ένα εντελώς διαφορετικό φαινόμενο από εκείνο της φαγοκύττωση και του φαινομένου της έντοσης (Sharma & Dey 2010). Μία βασική διαφορά μεταξύ φαγοκυττάρωσης και κανιβαλισμού είναι, ότι ενώ τα κανιβαλικά καρκινικά κύτταρα έχουν αποκλειστική προτίμηση σε ζωντανά κυρίως γειτονικά καρκινικά κύτταρα, τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν αποκλειστικά νεκρά κύτταρα (Sharma & Dey 2010).

1.2.1.5.1 Το φαινόμενο Endosis

Το φαινόμενο της έντοσης αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Overholtzer et al (2007) ως ένα μη αποπτωτικό πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται σε αποκολλημένα από το υπόστρωμα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Μετά την αποκόλληση ένα κύτταρο εισέρχεται προσωρινά εντός ενός άλλου γειτονικού κυττάρου παρουσιάζει δηλαδή χαρακτηριστικά κανιβαλισμού. Μελέτες έδειξαν (Overholtzer et al. 2007), ότι η διαδικασία της εισόδου είναι μία ενεργός διαδικασία που περιλαμβάνει ενεργοποίηση ενός Rho-ROCK σηματοδοτικού μονοπατιού στο εισερχόμενο κύτταρο και άσκηση μίας συσταλτικής δύναμης που εξαρτάται από τη Μυοσίνη στο κύτταρο δέκτη. Η μη ισορροπημένη εξαρτώμενη από τη μυρσίνη -II δύναμη και η συμπίεση στις συνάψεις πρόσφυσης οδηγούν το κύτταρο εντός του ξενιστή του (Yang & Li 2012). Το εισερχόμενο κύτταρο (**Εικόνα 24**) συνήθως αποικοδομείται από λυσοσωμάτα, κάτι που δείχνει ότι το φαινόμενο της έντοσης μπορεί να αποτελεί ένα νέο μονοπάτι για την καταστροφή των αποκολλημένων κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών. Όμως το εισερχόμενο κύτταρο μπορεί να παραμείνει ζωντανό ή και σε ορισμένες περιπτώσεις να ελευθερωθεί. Η παρουσία ενός ζωντανού κυττάρου στο κυτταρόπλασμα ενός άλλου κυττάρου, φαίνεται ότι μπορεί να διαταράξει το σχηματισμό συσταλτικού δακτυλίου κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου ξενιστή.



Εικόνα 24: Η τύχη του εισερχόμενου κυττάρου κατά το φαινόμενο Endosis (Πηγή: Florey et al. 2010)

Οι διαταραχές στην κυτταροκίνηση έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διπύρηνων κυττάρων τα οποία παράγουν στη συνέχεια ανευπλοειδείς κυτταρικές σειρές (cell lineages) (Krajcovic et al 2011, Janssen & Medema 2011). Η ανευπλοειδία είναι το φαινόμενο κατά το οποίο παράγεται διαφορετικός αριθμός χρωμοσωμάτων κατά τη διαίρεση ενός κυττάρου.

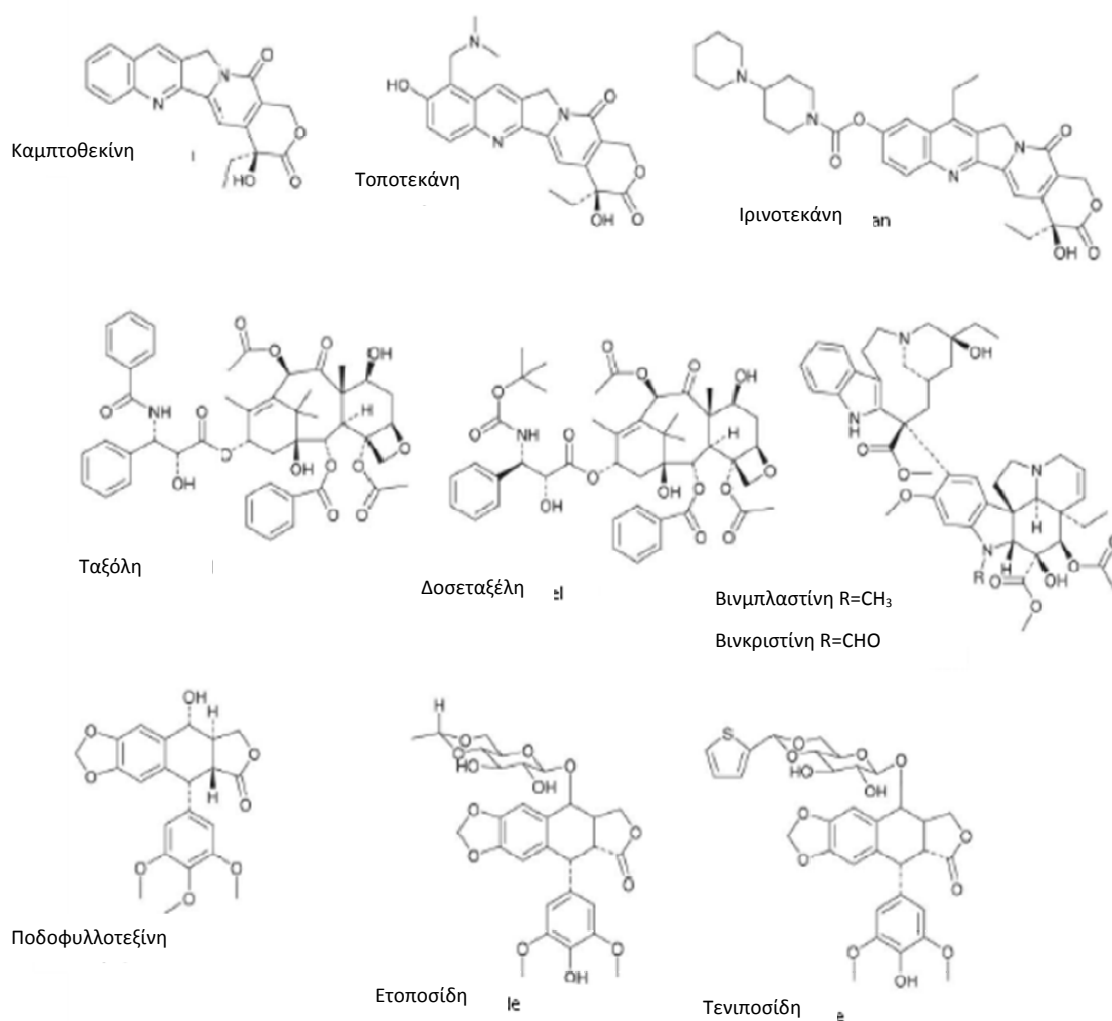
1.2.2 Φυτικής προέλευσης συστατικά με αντικαρκινική δράση

Η αναζήτηση φυτικής προέλευσης συστατικών με αντικαρκινική δράση άρχισε ουσιαστικά το 1950. Τα Vinca αλκαλοειδή, vinblastine και vincristine, τα οποία αναστέλλουν τη μίτωση (Hamburger & Hostettmann 1991), απομονώθηκαν από το *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae) (Balunas & Kinghorn 2005, Cragg & Newman, 2005) και χρησιμοποιήθηκαν κλινικά για περισσότερα από 40 χρόνια (van Der Heijden et al. 2004).

Οι κυτταροτοξικές ποδοφυλλοτοξίνες (Cragg & Newman, 2005) απομονώθηκαν με αλκοολική εκχύλιση από ρίζωμα φυτών του γένους *Podophyllum* (Podophyllaceae), *Podophyllum peltatum* Linnaeus και *Podophyllum emodii* Wallich, (Hamburger & Hostettmann 1991), τα οποία χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση του καρκίνου του δέρματος και των κονδυλωμάτων (Cragg & Newman, 2005). Η έρευνα οδήγησε την ανάπτυξη των κλινικά αποτελεσματικά παραγόντων etoposide and teniposide.

Το Εθνικό ινστιτούτο καρκίνου (N.C.I.) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής ξεκίνησε το 1960 ένα εκτεταμένο πρόγραμμα συλλογής φυτών το οποίο επικεντρώθηκε κυρίως σε εύκρατες περιοχές. Το πρόγραμμα αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη νέων χημειοτύπων με ένα ευρύ φάσμα κυτταροτοξικών ιδιοτήτων (Cassady & Duros, 1980), στο οποίο συμπεριλαμβάνονται οι ταξάνες και οι καμπτοθεκίνες, αλλά η ανάπτυξή τους σε κλινικά ενεργούς παράγοντες διήρκησε μία περίοδο 30 περίπου ετών, από τις αρχές του 1960 έως τη δεκαετία του 1990. Το Paclitaxel (taxol) αρχικά απομονώθηκε από το φλοιό του *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae). Υπάρχουν αναφορές ότι οι Ινδιάνοι χρησιμοποιούσαν τμήματα του *Taxus brevifolia* και άλλων ειδών *Taxus*, όπως τα *Taxus Canadensis* και Marshall, *Taxus baccata* L. για θεραπευτικούς σκοπούς, ενώ οι Ινδοί (Ayurvedic) χρησιμοποιούσαν φύλλα του *Taxus baccata* παραδοσιακά για την αντιμετώπιση του καρκίνου (Hartwell 1982). Αργότερα επετεύχθη η ημισυνθετική παρασκευή της δραστικής ουσίας από Μπεκατίνες, οι οποίες είναι πρόδρομες ενώσεις που βρίσκονται στα φύλλα του *Taxus baccata* (Ευρωπαϊκό έλατο). Το Docetaxel είναι μια άλλη ημισυνθετική ταξάλη με κλινική εφαρμογή.

Η Καμποθεκίνη απομονώθηκε από το ξύλο του Κινέζικου δέντρου *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) και χρησιμοποιήθηκε από το N.C.I. για κλινικές δοκιμές το 1970. Αν και η χρήση της αρχικά απορρίφτηκε λόγω σοβαρής τοξικότητας, εκτεταμένες έρευνες οδήγησαν στην ανάπτυξη των περισσότερο αποτελεσματικών παραγώγων τοποτεκαν και Ιρινοτεκαν (Cragg & Newman, 2005). Στην εικόνα **(Εικόνα 25)** αναφέρονται οι φυτικής προέλευσης αντικαρκινικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη.



Εικόνα 25: Φυτικής προέλευσης αντικαρκινικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη (Πηγή: Cragg & Newman, 2005 με τροποποιήσεις)

Το Flavopiridol είναι πλήρως συνθετικό, αλλά η δομή του φλαβονοειδούς έχει σαν βάση το συστατικό rohitukine, το οποίο απομονώθηκε από το είδος *Dysoxylum binectariferum* Hook f.

(Meliaceae). Το rohitukine διαθέτει αντιφλεγμονώδη και ανοσορυθμιστική δράση και χρησιμοποιείται για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στη χημειοπροφύλαξη που διαθέτουν τα φυτικής προέλευσης συστατικά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής με την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, αρωματικά φυτά κ.ά. (Kinghorn 2004, Russo et al. 2005, Greca & Zarrelli 2012, Kaliora & Kountouri 2012). Τα συστατικά αυτά στοχεύουν σε κυτταρικές διαδικασίες και σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται τόσο με την πρόληψη όσο και με τη θεραπεία του καρκίνου (Aggarwal et al. 2004).

1.3 Αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών

Τα αιθέρια έλαια είναι πολυσύνθετα, πτητικά μίγματα πολλών διαφορετικών ενώσεων που προσδίδουν στο φυτό που τα παράγει μια ιδιαίτερη οσμή και γεύση (Samuelsson 1996). Ο όρος έλαια μπορεί να θεωρηθεί παραπλανητικός δεδομένου ότι δεν πρόκειται για εστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα (τριγλυκερίδια). Πολλά από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες (τερπένια), μικρού μοριακού βάρους, κυρίως μόνο-, σεσκιτερπένια και σε μικρότερο βαθμό διτερπένια ή αλκοόλες και κετόνες με παρόμοιους δομικούς σκελετούς (Samuelsson 1994).

Η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου που παράγει ένα φυτό δεν εξαρτάται μόνο από το είδος του, αλλά και από πολλούς άλλους παράγοντες όπως το μικροκλίμα της περιοχής που αναπτύσσεται, το υψόμετρο, το έδαφος, το στάδιο ανάπτυξης και τον γονότυπο (Stahl-Biskup & Saez 2002). Ο χρόνος συλλογής (ώρα της ημέρας), η μέθοδος αποξήρανσης, ο τρόπος διατήρησης του αποξηραμένου φυτικού υλικού και η μέθοδος που εφαρμόζεται για την παραλαβή του είναι παράγοντες που επίσης επηρεάζουν τη σύσταση του αιθέριου ελαίου που παραλαμβάνεται (Πολυσίου 2002), και συνεπώς τη βιοδραστικότητά του.

1.3.1 Χρήση αρωματικών φυτών και αιθέριων ελαίων για φυτοπροστατευτικούς σκοπούς

Η εξέλιξη των επιστημονικών και τεχνολογικών γνώσεων στον τομέα της γεωργίας, η ανάγκη για παραγωγή προϊόντων με μικρότερη οικονομική, οικολογική και κοινωνική επιβάρυνση, καθώς και οι απαιτήσεις των καταναλωτών για παραγωγή ασφαλών προϊόντων απαλλαγμένων από υπολείμματα φυτοφαρμάκων, είχε ως αποτέλεσμα τη στρόφη της γεωργίας και την εφαρμογή εναλλακτικών συστημάτων καλλιέργειας, όπως είναι το σύστημα ολοκληρωμένης διαχείρισης της παραγωγής και η

βιολογική γεωργία. Στο πλαίσιο αυτό αναζητούνται εναλλακτικές λύσεις, έναντι της χρήση των κλασικών φυτοπροστατευτικών μέσων. Ενδιαφέρον ανάμεσα σε αυτά παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών, τα οποία αποτελούν μεταξύ άλλων, μέρος της χημικής άμυνας των φυτών που τα παράγουν, για την προστασία τους από εχθρούς και παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μία πρακτική τόσο στην παραδοσιακή όσο και στη βιολογική γεωργία για την προστασία της καλλιέργειας από εχθρούς είναι η φύτευση μεταξύ άλλων τοπικών ποικιλιών αρωματικών φυτών καλά προσαρμοσμένων στις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής. Τα επιλεγμένα φυτά απωθούν εχθρούς τους, προσελκύουν - φιλοξενούν ωφέλιμους οργανισμούς, αυξάνουν τη βιοποικιλότητα και τη σταθερότητα του αγροοικοσυστήματος. Πρόσφατες έρευνες σε διάφορες χώρες επιβεβαιώνουν ότι κάποια αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών παρουσιάζουν εντομοαπωθητικές, αποτρεπτικές, αντιτροφικές ή τοξικές ιδιότητες έναντι συγκεκριμένων φυτοφάγων εντόμων (Regnault – Rogers 1997). Αν και έχει διαπιστωθεί *In vitro* ότι ορισμένα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι ανταγωνιστικοί ανασταλτικοί παράγοντες της ακετυλοχολινεσεράσης, δεν φαίνεται η δράση αυτή να συσχετίζεται με την τοξικότητα στα έντομα *in vivo*. Σύμφωνα με έρευνες φαίνεται ότι συστατικά των αιθέριων ελαίων δρουν στο οκτοπαμινενεργό νευρικό σύστημα των εντόμων (Isman 2000, Kostyukovsky *et al.* 2002), το οποίο διαθέτουν μόνο τα έντομα και όχι ο άνθρωπος ή άλλα θερμόαιμα. Η οκτοπαμίνη είναι το λειτουργικό ανάλογο της νοραδρεναλίνης στα έντομα, ρυθμίζει πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες και συμπεριφορές αυτών των οργανισμών (Μοναστηριώτη 2003, Kostyukovsky *et al.* 2002). Στην έλλειψη υποδοχέων οκτοπαμίνης στα σπονδυλωτά οφείλεται η επιλεκτικότητα των αιθέριων ελαίων, δηλαδή η τοξικότητα στα έντομα και όχι στα θηλαστικά.

Έχει διαπιστωθεί ότι κάποια αιθέρια έλαια και συγκεκριμένα βιοδραστικά συστατικά τους επιδρούν στην ανάπτυξη σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Μπούρμπος 1997, Pitarokili *et al.* 2002, Bouchra 2003, Daferera *et al.* 2000). Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα αιθέρια έλαια διαθέτουν ακαρεοκτόνες (Roh *et al.* 2013), νηματοδοκτόνες ιδιότητες (Fe Andrés *et al.* 2012) και τελευταία διερευνάται η χρήση τους ως βιοζιζανιοκτόνα (Tworkoski 2002). Η αντιβακτηριακή δράση κάποιων αιθέριων ελαίων σε παγοπυρηνοποιητικά βακτήρια (INA) μελετάται και διερευνάται η δυνατότητα εφαρμογής τους με σκοπό την προστασία ευαίσθητων καλλιεργειών από παγετό (Karamanoli *et al.* 2000).

Η χρήση αιθέριων ελαίων για την προστασία των φυτών από φυτοπαράσιτα, επιτρέπεται στη βιολογική γεωργία βάση του κανονισμού Ε.Ο.Κ. 2092/91. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η δράση

τους θεωρείται επιλεκτική, εκλεκτική, βιοδιασπώνται και παρουσιάζουν μικρή τοξικότητα στα θερμόαιμα. Τελευταία διερευνάται η δυνατότητα χρήσης αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών όχι μόνο στη βιολογική γεωργία αλλά και η χρήση τους εναλλακτικά των κλασικών φυτοπροστατευτικών ουσιών, σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης των φυτοπαρασίτων.

Επισημαίνεται πως η χώρα μας είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αρωματικά φυτά. Παρόλα αυτά δεν έχουν δημιουργηθεί οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την αποτελεσματικότερη αξιοποίησή τους.

1.3.2 Χρήση αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Πολλά αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών έχει διαπιστωθεί, ότι διαθέτουν αντιμυκητικές ιδιότητες. Παρόλο που η αντιμικροβιακή δράση και η τοξικότητα των τερπενίων έχει τεκμηριωθεί, ο τρόπος δράσης τους είναι πολύπλοκος και σε πολλές περιπτώσεις δεν έχει διερευνηθεί πλήρως (Koroch et al. 2007). Ένα κοινό χαρακτηριστικό των συστατικών των αιθέριων ελαίων είναι η υδροφοβικότητα των μορίων τους. Σύμφωνα με μελέτες κύριος στόχος της αντιμικροβιακής δράσης αυτών των συστατικών είναι η κυτταρική μεμβράνη (Stamati et al. 1999, Bakkali et al. 2008). Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων συσσωρεύονται στην κυτταρική μεμβράνη και αυξάνουν την διαπερατότητά της (Stamati et al. 1999, Bakkali et al. 2008). Αρχικά παρατηρείται μία διαρροή ιόντων K^+ και στη συνέχεια διαρροή ενδοκυττάρων συστατικών. Στις ζύμες τα συστατικά των αιθέριων ελαίων αναστέλλουν τη σύνθεση της εργοστερόλης (Koroch et al. 2007).

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες η αντιμυκητική δράση ενός αιθέριου ελαίου μπορεί να παρατηρηθεί, είτε με την εξ'επαφής εφαρμογή του, είτε με την υποκαπνιστική δράση των πτητικών του ενώσεων (Feng et al. 2011, Ferdes & Ungureanu 2012). Πιο ισχυρή είναι η αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν οι φαινόλες και ακολουθούν οι αλδεΐδες, οι κετόνες, οι αλκοόλες, οι εστέρες και οι υδρογονάνθρακες (Koroch et al. 2007).

Ένας από τους λόγους, για τους οποίους η χρήση αιθέριων ελαίων παρουσιάζει ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων, σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στα συνήθως χρησιμοποιούμενα συνθετικά μυκητοκτόνα. Το αιθέριο αποτελείται συνήθως από 40 ή και 60 διαφορετικά συστατικά. Ένα – δύο από αυτά αποτελούν τα κύρια συστατικά, ενώ τα υπόλοιπα, που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες, χαρακτηρίζονται ως δευτερεύοντα. Οι δευτερεύουσες ενώσεις των αιθέριων ελαίων μπορούν να ενεργήσουν συνεργηστικά και να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα των κύριων συστατικών. Επειδή το

αιθέριο έλαιο αποτελείται από μίγμα συστατικών, διαφορετικά συστατικά μπορεί να εκδηλώνουν με διαφορετικό τρόπο την αντιμικροβιακή τους δράση με αποτέλεσμα ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας να είναι μειωμένος συγκριτικά με τη χρήση καθαρών ενώσεων. Επιπλέον σημειώνεται ότι τα αιθέρια έλαια και συστατικά τους, που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα απαλλάσσονται από την ανάγκη τοξικολογικής μελέτης και θεωρούνται ασφαλή (GRAS: General Recognized As Safe). Έτσι οι βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων μπορούν να φέρουν ένα αιθέριο έλαιο με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες ως σκεύασμα στην αγορά σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με ένα συμβατικό φυτοπροστατευτικό προϊόν (Isman 2000). Παρόλο που τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, ερευνητικά αποτελέσματα έδειξαν ότι, μερικοί μικροοργανισμοί εδάφους στα μεσογειακά οικοσυστήματα ενεργοποιούνται από την παρουσία τους και μπορούν να τα χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Συνεπώς φαίνεται πως δεν βιοσυσσωρεύονται εφόσον οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών (Vokou & Liotiri 1999).

Οι μυκητολογικές ασθένειες είναι η κύρια αιτία που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες μετά τη συγκομιδή των φρούτων και λαχανικών, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, της μεταφοράς και της εμπορίας. Λόγω της υψηλής τοξικότητάς των συνθετικών μυκητοκτόνων, της μεγάλης υπολειμματικότητάς τους και της μακράς περιόδου αποικοδόμησής τους, της ρύπανσης του περιβάλλοντος, τις επιπτώσεις στα τρόφιμα και πιθανές παρενέργειες στον άνθρωπο, η χρήση τους για την προστασία από μετασυλλεκτικές έχει περιοριστεί. Η χρήση των αιθέριων ελαίων και ιδιαίτερα εκείνων που χαρακτηρίζονται ως GRAS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την προστασία φρούτων και λαχανικών από μετασυλλεκτικές σήψεις.

1.4 Σκοπός της διατριβής

Στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν η αναζήτηση αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών που αυτοφύονται στη περιοχή της Ηπείρου και παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη μελέτη των βιολογικών τους δράσεων με έμφαση στην πιθανή αντικαρκινική τους δράση. Η επιλογή των φυτικών ειδών, έγινε σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές ή προσωπικές συνεντεύξεις. Τα επιλεγμένα είδη αναζητήθηκαν, συλλέχθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή των βιοδραστικών τους συστατικών έπειτα από μία σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων. Η πιθανή αντικαρκινική δράση μελετήθηκε, έπειτα από εφαρμογή των εκχυλισμάτων, σε μια επιλεγμένη καρκινική κυτταρική σειρά (A549), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο. Η βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων και η μορφή του κυτταρικού θανάτου εκτιμήθηκε ποσοτικά έπειτα από σήμανση των κυττάρων με ανεξίνη (Annexin V-FITC), ιωδιούχο προπίδιο (P.I) και ανάλυσή τους με κυτταρομετρία ροής. Έπειτα από στατιστική αξιολόγηση των πρώτων αποτελεσμάτων διερευνήθηκε η κυτταροτοξικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων που παρουσίασαν ενδιαφέρον με χρονο-εξαρτώμενα και δοσο-εξαρτώμενα πειράματα.

Κριτήριο για την περαιτέρω επιλογή των φυτικών ειδών ήταν η ένταση και η μορφή του κυτταρικού θανάτου. Ένα από τα είδη, που επιλέχθηκαν παρουσίασε μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως προς την ικανότητά του να επάγει τον μηχανισμό της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Με μικροσκοπική παρατήρηση, έπειτα από κατάλληλες χρώσεις, ελέγχθηκαν οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις που προκαλούν τα επιλεγμένα εκχυλίσματα στα καρκινικά κύτταρα A549. Η εκλεκτικότητα των εκχυλισμάτων ελέγχθηκε με μορφολογικά κριτήρια έπειτα από επίδρασή τους σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Οι τεχνικές του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western blot χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Επειδή η βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος εξαρτάται από τη χημική του σύσταση προσδιορίστηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS), τόσο οι πτητικές ενώσεις που παράγει το αρωματικό φυτό, όσο και αυτές που περιέχονται στο MeOH εκχύλισμα και το εκχύλισμα που εφαρμόστηκε στα κύτταρα. Τα αποτελέσματα της ποιοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου συνέβαλαν στον ακριβή προσδιορισμό του είδους του αρωματικού φυτού που ανήκει στην ομάδα του *S. montana* και του χημειότυπου που ανήκει.

Το εκχύλισμα του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* που παρουσίασε ενδιαφέρον για την αντικαρκινική του δράση, καθώς και το αιθέριο έλαιο που παράγει, δοκιμάστηκαν για την αντιμυκητική τους δράση σε σημαντικής σπουδαιότητας φυτοπαθογόνα που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις σε καρπούς τομάτας και ένα εδαφογενές παθογόνο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* από την τράπεζα του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, ενώ στελέχη των φυτοπαθογόνων *Botrytis cinerea* και *Alternaria alternata* απομονώθηκαν από προσβλημένους καρπούς τομάτας, ταυτοποιήθηκαν, καλλιεργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές.

Κεφάλαιο 2^ο

Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Στη συνέχεια αναφέρονται τα όργανα, οι συσκευές, τα αντιδραστήρια, το γυάλινο και αναλώσιμο υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης.

2.1.1 Όργανα και συσκευές

1. Αέριο- χρωματογράφος (Master GC Fast chromatograph, Dani) εφοδιασμένος με φασματογράφο μάζας (TOF MS Dani), αυτόματο δειγματολήπτη (Master AS Dani) και Dynamic Head space δειγματολήπτη (Master DHS, Dani).
2. Αναδευτήρας με δίνη (Vortex -2 Genie, model G-560 E, Scientific industries INC).
3. Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss optronic, Germany).
4. Αποστακτική συσκευή τύπου Clevenger.
5. Ηλεκτρονικός ζυγός δύο (2) δεκαδικών ψηφίων (Kern EW 2200-2NM, Kern @ Sohn GmbH, Germany).
6. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων (4) δεκαδικών ψηφίων (XT 120A, Precisa, Precisa instrument Ltd, Switzerland).
7. Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών (Elvem, EQA, Hellas).
8. Θάλαμος επώασης (Incubator, RS, Biotech, Galaxy, R).
9. Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar Flow, Hood Class II type A/B3, Nuair).
10. Θερμομανδύας κατάλληλος για σφαιρική φιάλη 1 lt.
11. Θερμοστατούμενη πλάκα ανάδευσης (Cone-112E, Heidolph, Controla AE).
12. Κασετίνα εμφάνισης φιλμ (LifeRay 24x30 cm, ID. No., LI000216034, Ferrania Incorp., Italy).
13. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (Steam sterilizer, Raypa, E. Espinar S.L., Spain).
14. Κυτταρόμετρο (FACS CALIBUR , Becton Dickinson).
15. Λουτρό υπερήχων (Bandelin sonorex, Typ RC5Z, f 35KHZ).
16. Λυοφιλοποιητής (Alpha 1-2 LO plus, Crist).
17. Μύλος άλεσης φυτικών ιστών (Polymix, Technology by Kinematica, culatti Typ MFC, Nr 8599975).
18. Οπτικό μικροσκόπιο (Nikon eclipse 50i) με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα.
19. Περιστρεφόμενος συμπυκνωτής (Rotary evaporator, Laborota 4000, Heidolph).
20. Πλάκα ανάδευσης (Heidolf Duomax 1030).
21. Πλάκα ανάδευσης (Orto Alresa, Espana).

22. Συμπυκνωτής ατμόσφαιρας αζώτου.
23. Συσκευή ανοσοαποτύπωσης (Hoffer TE 70 Semi-dry, Amersham Biosciences Corp, USA).
24. Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini protean, Biorad).
25. Σύστημα φωτογράφισης (Power shot G6 , 7.1 mega pixels, Canon).
26. Τριοφθάλμιο μικροσκόπιο (Leica, DM1000).
27. Τριοφθάλμιο στερεοσκόπιο (Leica, MZ75).
28. Τριοφθάλμιο μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon eclipse E 400).
29. Υδατόλουτρο (GFL 1052).
30. Υδατόλουτρο (W-22, memmert, Germany).
31. Υπερφυγόκεντρος (Hettich micro 29, Germany).
32. Φορητό δορυφορικό σύστημα πλοήγησης (GPS).
33. Φυγόκεντρος (Hettich Rotofix 32, Germany).
34. Φυγόκεντρος (Heraeus, Laborfuge A, Heraeus sepatetions Technik GmbH).
35. Φωτογραφική μηχανή (Nikon coolpix 4500 digital camera).

2.1.2 Αντιδραστήρια

1. Αιθανόλη (C_2H_6O , MW:46.07, assay 99.8 %, Riedel-de Haen).
2. Ακετόνη .
3. Ακρυλαμίδιο (Acrylamide, C_3H_5NO , Merck).
4. Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V, assay 96 %, Cat. No. A-2153, Sigma).
5. Ammonium persulfate (APS) (Cat. No.161-0700, Bio-Rad).
6. Αναστολείς πρωτεασών (Cat. No. P5340 Sigma).
7. Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) 7.5 % w/v (Cat. No. 2080-060, Gibco-BRL).
8. Annexin V- FITC (100 tests, Cat. No. 556420, BD Biosciences).
9. Annexin V binding buffer (10 x concentrate Cat. No. 556454, BD Biosciences).
10. Αντιβιοτικό (Antibiotic-Antimycotic): 10000 U/ml Penicillin G sodium, 10000 μ g/ml Streptomycin Sulfate, 25 μ g/ml amphotericin B as fungizone (Cat. No. 15240-062, Gibco).
11. Αντίσωμα Caspase-3 (E-8) (SC-7272, Mouse monoclonar IgG2a, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA).
12. Αντίσωμα PARP -1 (F-2) (SC-8007, Mouse monoclonar IgG2a, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA).

13. Αντίσωμα β-ακτίνης (β-actin antibody, Cat No. 4967, Cell Signalling).
14. Αντίσωμα (Mouse IgG, Prod.#31452 Pierce Biotechnology, Rockford USA).
15. Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) Merck.
16. Bis N, N'-Methylene-bis acrylamide (Cat. No. 161-0200, Bio-Rad).
17. Bromophenol Blue Sodium Salt ($\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{SNa}$, Cat. No. B-8026, Sigma).
18. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Cat. No.161-0400, Bio-Rad).
19. Γλυκερόλη (Glycerol), ($\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$, Assay 99.5 %, Analar).
20. Γλυκίνη (Glycine), (Cat. 161-0718, Bio-Rad).
21. Γλουταμίνη (L-Glutamine) 200 mM, (Cat. No.K0282, Seromed).
22. Διάλυμα αλκανίων ($\text{C}_8 - \text{C}_{20}$) (P. Code 101153511, Fluka, Aldrich-Sigma).
23. Διάλυμα εμφάνισης φιλμ (Kodak X-Ray Developer pH=9-12, Ref. Cat. No. 5070933, Kodak Industrie, Cedex France).
24. Διαλύματα χημειοφωταύγειας (Horseradish Peroxidase labelled antibodies, ECL 1 & 2 RPN 2209 AmershamBiosciences, UK, περιέχει: Detection reagent 1, 125 mL, Cat. No. 1059243, Detection reagent 2, 125 mL, Cat. No. 1059250).
25. 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) .
26. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC), (Product number 100466.0500, Merck)
27. Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide) (αποστειρωμένο), ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, Cat. No. 11101-011, Gibco).
28. DPX mountant (code RRSP 29-D, Atom scientific LTD, UK.).
29. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) (cat No. 31885-023, Gibco).
30. Εξάνιο (n-Hexane), ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, 95%, A.R., Code A16C11X LabScan analytical Sciences).
31. Giemsa A zur Eosin Methylblau lösung, (Art. Nr. 8737).
32. Ham's F12K (Kaighn's) Medium, (Cat. No. 21127022, Gibco).
33. Hematoxyline Harris acidified (with acetic acid) (code RRSP 68-F, Atom scientific LTD, UK.).
34. Ηωσίνη
35. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA) 1x, 0.5 g/l trypsin, 0.2 g/l EDTA in PBS 1x, (Cat. No. L11-004, PAA Laboratories).
36. Ισοπροπανόλη για HPLC (59307 Sigma -Aldrich).
37. Ιωδιούχο προπίδιο (Propidium iodide) staining solution (Cat. No. 556463, BD Biosciences).
38. Μεθανόλη (Methanol), (CH_3OH , 99.8 %, 131091.1212, Panreac).

39. Ξυλόλη .
40. Ορρός εμβρύου βοός (Foetal Bovine Serum-FBS) (Cat. No. A15-101, PAA, The Cell Culture Company).
41. Potato Dextrose Agar (PDA) (Cat. No. 4019352, Biolife).
42. p-Phenylenediamine, (M.B. 108.14, P6001, Cat. No.612-028-00-6, Sigma).
43. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 1X), (Cat. No. 10010-015 Gibco).
44. Trypan blue solution, ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$, cat No. 93595, FluKa analytical, Sigma-Aldrich).
45. Tween 80 (Γαλακτωματοποιητής).
46. Χλωροφόρμιο (MB:119,38, assay 99.99 %,Fisher Scientific).
47. Φορμαλδεΐδη (formaldehyde), (CH_2O , 37-38%, 1313228.1212 Panreac).
48. May Grünwald zur Eosin Methylblau lösung (Art. Nr.80691).
49. SDS (Cat. No.161-0301, Bio-Rad).
50. Μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol),(C_2H_6OS , Cat. No. M-3148, Sigma).
51. Oil red O.
52. Πρότυπα μοριακά βάρη (Marker, Prestained protein Ladder 10-170 kDa, proteins are covalently coupled with a blue chromophore except for a reference one-72 kDa, coupled with an orange dye, Cat. No. #SM0671, Fermentas).
53. Trizma Base ($C_4H_{11}NO_3$, MW:121.1, Cat. No. T-1503, Sigma).
54. Μεθανόλη (Methanol, Riedel-de Haen).
55. Μεμβράνη PVDF (Immuno-Blot PVDF membrane for N-terminal sequencing, Polyvinylidene difluoride, 140-150 μg πρωτεΐνης/ cm^2 μεμβράνης, Cat. No. 162-0177, 26 cm x 3.3 m, 1 roll, Bio-Rad).
56. Papanikolaou stain OG6 (code RRSP 122-6F, Atom scientific LTD, UK.).
57. Papanicolaou stain EA 50 (code RRSP 121-F, Atom scientific LTD, UK.).
58. TEMED ($C_6H_{16}N_2$, Assay 99 %, Cat. No.T-8133,Sigma).
59. Trizma Base ($C_4H_{11}NO_3$, 99.8 %, Cat. No. T-1503, Sigma).
60. Tween-20 (Cat. No. 27,434-8, Aldrich).
61. Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου.
62. Οξικό οξύ (Acetic acid glacial, MW:60.05, Carlo Erba).
63. Υγρό στερέωσης του φιλμ (Kodak X-Ray Fixer, Ref. Cat. No. 5071071, 20 l, Kodak Industrie, Cedex France).

64. Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4 , MW:98.00, assay 85 %, Riedel-de Haen).
65. Χρωστική Brilliant Blue G-250 ($\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$, purity 98.0 %, Cat. No. B-0770, Sigma).

2.1.3 Αναλώσιμα υλικά

1. Αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber).
2. Αλουμινένια δοχεία.
3. Αμπούλες των 2 mL (cryovials).
4. Αντικειμενοφόροι πλάκες 76x26, Knittel glass.
5. Αντικειμενοφόροι πλάκες, Menzel Gläser Superfrost plus, 25 x 75 x 1mm, Thermo scientific.
6. Αποστειρωμένα Corning των 15, 30 και 50 mL.
7. Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 45 και 90 mm, Cellstar.
8. Αποστειρωμένες πιπέτες μιας χρήσης των 5 και 10 mL.
9. Αποστειρωμένο φίλτρο 0.45 μm (Sterile Syringe Filter, Part. No. 431220, Corning, Germany).
10. Γυάλινα φιαλίδια 5 mL με βιδωτό πώμα.
11. Γυάλινες πιπέτες των 1, 2, 5 και 10 mL.
12. Γυάλινα φιαλίδια 20 mL κατάλληλο για Dynamic Head space δειγματολήπτη.
13. Γυάλινες φιάλες 250 mL, 1 lt με βιδωτό πώμα.
14. Γυάλινο Χωνί.
15. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
16. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα.
17. Διηθητικό χαρτί Whatman.
18. Θερμόμετρο αλκοόλης.
19. Καλυπτρίδες.
20. Κλαδευτήρι.
21. Μαγνητικά βιδωτά πώματα, ND18, 1.5mm, (Art. Nr.97162, Roth).
22. Μικροβιολογικός κρίκος.
23. Παρασκευαστική βελόνα.
24. Πιπέτες paster.
25. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 5 mL (σωληνάκια Flow).
26. Πλαστικός περιέκτης.
27. Πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου Ependorf των 2 mL.

- 28.** Σφαιρική φιάλη 1 lt με εσφυρινισμένο στόμιο.
- 29.** Σφαιρική φιάλη 250 mL, Biomex.
- 30.** Συσκευή φιλτραρίσματος nuclepore, cat No. 800 922 0361, Whatman Schleicher& Schuell.
- 31.** Tips για αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες.
- 32.** NL17Φίλτρα Μεμβράνης πολυαμιδίου, 0.45 μ m, ϕ 25 mm cat No. 10 414 106, Whatman.
- 33.** Φιλμ (Kodak Biomax Xar Film, Scientific Imaging Film for Biological Imaging, 13x18 cm, 50 sheets, Kodak Industrie, Cedex France).
- 34.** Φιαλίδια 20 mL για μαγνητικά βιδωτά πώματα, 1261000120, DANI.
- 35.** Φιαλίδια για autosampler 32x11.6mm

2.2 Φυτικό Υλικό

2.2.1 Συλλογή φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειραματισμού, συλλέχθηκε από την αυτοφυή χλωρίδα της Ηπείρου. Κριτήριο για την επιλογή των φυτικών ειδών αποτέλεσαν οι πληροφορίες που έχουμε από την παραδοσιακή ιατρική, τη λαϊκή παράδοση και τα μέχρι σήμερα ερευνητικά δεδομένα αναφορικά με τη βιολογική τους δράση.

Τα φυτικά είδη τα οποία επιλέχθηκαν εντοπίστηκαν, καταγράφηκε το γεωγραφικό πλάτος, μήκος και το υψόμετρο της περιοχής όπου φύονται και συλλέχθηκαν σε κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τις πρωινές ώρες. Για κάθε φυτικό είδος συλλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από υγιή φυτά.

2.2.2 Ταυτοποίηση φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό μεταφέρθηκε στο εργαστήριο μικροσκοπίας, τμήμα τεχνολόγων γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου όπου ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια του Flora Europae (Tutin et al. 1993), του Mountain Flora of Greece (Baden 1991) και τη χρήση τριοφθάλμιου στερεοσκοπίου Laica. Για την ταυτοποίηση του είδους που αρχικά ταξινομήθηκε στην ομάδα του *Satureja montana* L. χρησιμοποιήθηκε η βιοσυστηματική μελέτη του *S. montana* στη χώρα μας, της Δαρδιώτη (2005) σύμφωνα την οποία η ποσοτική και ποιοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά για τη διάκριση των ειδών της ομάδας του *S. montana* (Δαρδιώτη 2005). Ορισμένα σημαντικά για την ταυτοποίηση μορφολογικά χαρακτηριστικά φωτογραφήθηκαν με την προσαρμογή συστήματος φωτογράφησης (Sonny) στο τριοφθάλμιο στερεοσκόπιο.

2.2.3 Αποξήρανση φυτικού υλικού

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές αποξηράνθηκε με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης στο εργαστήριο φαρμακολογίας, τμήμα τεχνολόγων γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, ενώ ένα μέρος του φυτικού υλικού της οικογένειας Lamiaceae αποξηράνθηκε με την μέθοδο της αεροξήρανσης στο εργαστήριο αρωματικών και βιομηχανικών φυτών, τμήμα τεχνολόγων γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου.

- **Πειραματική πορεία**

Λυοφιλοποίηση

Αρχικά σημειώθηκε το βάρος του δοχείου (gr). Στη συνέχεια το νωπό φυτικό υλικό τοποθετήθηκε στο δοχείο και λήφθηκε εκ νέου το βάρος (βάρος δοχείου + βάρος φυτικού ιστού σε gr). Το δοχείο κλείστηκε, αναγράφηκαν τα στοιχεία του δείγματος και τοποθετήθηκε στους -20 °C μέχρι την αποξήρανσή του με τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης. Η λυοφιλοποίηση διήρκησε 24-48 ώρες ανάλογα με το είδος του φυτού. Μετά την αποξήρανση του δείγματος λήφθηκε το βάρος του δοχείου με το αποξηραμένο φυτικό υλικό (gr). Υπολογίστηκε η περιεχόμενη υγρασία του φυτικού ιστού ως εξής:

$$\text{Υγρασία}\% = \frac{B_{\delta+\nu} - B_{\delta+\xi}}{B_{\delta+\nu} - B_{\delta}} \cdot 100$$

Όπου :

B_{δ} : Βάρος δοχείου (gr)

$B_{\delta+\nu}$: Βάρος δοχείου+νωπού φυτικού ιστού (gr)

$B_{\delta+\xi}$: Βάρος δοχείου+ξηρού φυτικού ιστού (gr)

Αεροξήρανση

Ένα μέρος του φυτικού υλικού που συλλέχθηκε από αρωματικά φυτά αποξηράνθηκε σε συνθήκες δωματίου, με καλό αερισμό και περιορισμένο φυσικό φωτισμό για την προστασία τυχόν φωτοευαίσθητων συστατικών. Το φυτικό υλικό τοποθετήθηκε επάνω σε φύλλα διηθητικού χαρτιού και απλώθηκε σε λεπτά στρώματα για να διευκολυνθεί η αποξήρανσή του. Μετά από 10 περίπου ημέρες τοποθετήθηκε σε χάρτινα κιβώτια στα οποία και διατηρήθηκε μέχρι την παραλαβή του αιθέριου ελαίου.

2.2.4 Ομογενοποίηση φυτικού υλικού

Το λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό ομογενοποιήθηκε με κατάλληλο μύλο άλεσης φυτικών ιστών, ο οποίος διέθετε κόσκινο για την επιλογή του μεγέθους των τεμαχιδίων. Επιλέχθηκε διάμετρος πόρων 2 mm επειδή μικρότερο μέγεθος τεμαχιδίων δημιουργεί συνήθως προβλήματα στον διαχωρισμό των στερεών συστατικών από το εκχύλισμα. Το κονιορτοποιημένο φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε γυάλινα δοχεία με βιδωτό πώμα μέχρι τη χρήση του.

2.2.5 Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών

Για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων και για τα πτητικά συστατικά (αιθέριο έλαιο) των αρωματικών φυτών η μέθοδος της υδροαπόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger.

2.2.5.1 Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων

Εκχυλίστηκε λυοφιλοποιημένο, κονιορτοποιημένο φυτικό υλικό και επιλέχθηκε αναλογία φυτικού ιστού-διαλύτη 1:10 (Abdel-Massih *et al* 2010, Li *et al.* 2009, Ljubuncic *et al.* 2005, Madsen *et al.* 1998, Miliuskas *et al.* 2004, Albu *et al.* 2004). Το κονιορτοποιημένο φυτικό υλικό επιτρέπει την επαφή του διαλύτη με μεγαλύτερη επιφάνεια φυτικού υλικού. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης διατηρήθηκε κάτω από 40 °C με την προσθήκη κύβων πάγου.

- **Πειραματική πορεία**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα μεταφέρθηκε 1 gr φυτικού ιστού και προστέθηκαν 10 mL διαλύτη. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στο λουτρό υπερήχων. Εφαρμόστηκαν τρεις (3) κύκλοι των 5 min με ενδιάμεσες αναδευσεις (1 min) σε δίνη (vortex). Η μέγιστη θερμοκρασία εκχύλισης (40 °C) ελέγχθηκε με την προσθήκη κύβων πάγου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 5 min για το διαχωρισμό της υγρής από την στερεά φάση, διήθηση του εκχυλίσματος σε ηθμό, συλλογή σε δοκιμαστικούς σωλήνες με βιδωτό πώμα, σήμανση και αποθήκευση στους -20 °C μέχρι τη χρήση του. Ως διαλύτες στα προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν η μεθανόλη, το εξάνιο, απεσταγμένο νερό περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη, και απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια των πειραμάτων ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη.

2.2.5.2 Υδροαπόσταξη

Το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε στο εργαστήριο αρωματικών και βιομηχανικών φυτών, τμήμα τεχνολόγων γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου με υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger (**Εικόνα 26**) από λυοφιλοποιημένο και αεροξηραμένο φυτικό υλικό. Για την απόσταξη χρησιμοποιήθηκε το υπέργειο μέρος των φυτών στο στάδιο της άνθισης με εξαίρεση το φυτικό υλικό του είδους *S. triloba* το οποίο είχε απανθίσει.

- **Πειραματική πορεία**

Το αποξηραμένο φυτικό υλικό κόπηκε σε τμήματα μήκους 2-3 cm για να χωρά στη σφαιρική φιάλη. Η διάρκεια της απόσταξης ήταν δύο (2) ώρες. Το αιθέριο έλαιο μετρήθηκε στον

βαθμονομημένο σωλήνα της συσκευής, παραλήφθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, αποξηράνθηκε με άνυδροθειικό νάτριο (Na_2SO_4) και τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο. Στον υπερκείμενο χώρο του αιθέριου ελαίου διοχετεύθηκε αέριο άζωτο (N_2) για να αποφευχθεί η οξείδωση των ευαίσθητων συστατικών και αποθηκεύθηκε σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να αναλυθεί ή να χρησιμοποιηθεί στις βιοδοκιμές. Η επί τοις εκατό (%) περιεκτικότητα του φυτικού ιστού σε αιθέριο έλαιο εκφράστηκε σε mL αιθέριου ελαίου ανά 100 gr ξηρής φυτικής βιομάζας ($\text{mL } 100 \text{ gr}^{-1} \text{ dw}$).



Εικόνα 26: Αποστακτική συσκευή με θερμομανδύα του Εργαστηρίου Αρωματικών και Βιομηχανικών Φυτών (Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου)

2.3 Βιοδοκιμές

2.3.1 Έλεγχος αντικαρκινικής δράσης

Για την διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων με μορφολογικά και βιοχημικά κριτήρια, χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549. Η κυτταρική σειρά A549 δημιουργήθηκε το 1972 από τον D.J. Giard (Giard *et al.* 1973) από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων που απομονώθηκαν από επιθήλιο πνεύμονα 58χρόνου άνδρα από τον Καύκασο. Έχει επίπεδο βιοασφάλειας (Biosafety Level) 1 και ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 24 ώρες. Σύμφωνα με μελέτες (Foster *et al.* 1998)

τα A549 κύτταρα παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τα επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα τύπου II και θεωρούνται κατάλληλα για τη μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο δρουν οι φαρμακευτικές ουσίες στο επιθήλιο του πνεύμονα.

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων που παρουσίασαν ενδιαφέρον για την αντικαρκινική τους δράση σε φυσιολογικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες πνεύμονα.

2.3.1.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς A549 και ινοβλαστών πνεύμονα

- **Διαλύματα εργασίας**

- Διάλυμα 12 N αιθανόλης

- 350 ml απόλυτης αιθανόλης συμπληρώθηκαν μέχρι τελικού όγκου 500 ml με νερό. Το διάλυμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αδρανοποίηση FBS

- Το παρασκεύασμα του εμπορίου FBS απενεργοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 60 °C για 30 min. Στη συνέχεια διηθήθηκε σε αποστειρωμένο φίλτρο και διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα corning των 52 ml κάτω από στείρες συνθήκες και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C.

- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια A549 κυττάρων: Ham's F12K τελικής συγκέντρωσης 10 % v/v σε FBS, 2 mM γλουταμίνη, 14.2 mM (1.5 g L⁻¹) Na₂CO₃, 100 U/ml σε αντιβιοτικό. Στα 500 mL θρεπτικού υλικού F12K προστέθηκαν 52 mL αδρανοποιημένου FBS, 5 mL γλουταμίνης, 10 mL ανθρακικού νατρίου και 5 ml αντιβιοτικού σε στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό διατηρήθηκε στους 4 °C.

- Πλήρες θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια ινοβλαστών πνεύμονα: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) τελικής συγκεντρώσεως 10 % v/v σε FBS, 2 mM γλουταμίνη, 2.2 mM γλυκόζη (0,4 % w/v), 14.2 mM (1.5 g L⁻¹) Na₂CO₃, 100 U/mL σε αντιβιοτικό.

- Στα 500 mL θρεπτικού υλικού DMEM προστέθηκαν 52 mL αδρανοποιημένου FBS, 5 mL γλουταμίνης, 10 mL ανθρακικού νατρίου, 5 mL αντιβιοτικού και 5 mL γλυκόζη σε στείρες συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό διατηρήθηκε στους 4 °C.

2.3.1.1.1 Απόψυξη, ανασύσταση και ανάπτυξη κυττάρων

Οι αμπούλες με το απόθεμα των κυττάρων από τους -80 °C τοποθετήθηκαν, για 1-2 min, σε υδατόλουτρο στους 37 °C για να ξεπαγώσουν τα κύτταρα. Σε τρυβλίο των 90 mm μεταφέρθηκαν 10

mL πλήρες θρεπτικό υλικό κάτω από στείρες συνθήκες. Μετά από προσεκτική αναδιασπορά των κυττάρων 0.5 mL αιωρήματος σπορίων μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο με το πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά, παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, 5% CO₂, ώσπου να σχηματίσουν πλήρες ταπήτιο.

2.3.1.1.2 Ανακαλλιέργεια, συλλογή και διαμοιρασμός των κυττάρων

Το πλήρες θρεπτικό, το διάλυμα PBS και το διάλυμα της θρυψίνης τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min πριν τη χρήση τους. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα τρυβλία που είχαν σχηματίσει πλήρες ταπήτιο μεταφέρθηκαν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και το ταπήτιο των κυττάρων εκπλύθηκε με 3 mL PBS. Τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν με 3 mL διαλύματος Trypsin-EDTA και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο για 10 min. Μετά την έξοδό τους τα τρυβλία ανακινήθηκαν ελαφρώς και ακολούθησε αδρανοποίηση της θρυψίνης με 3 mL PBS. Το περιεχόμενο δύο (2) τρυβλίων μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο corning. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 2.000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε, το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε σε 1 mL πλήρες θρεπτικό και διαμοιράστηκε σε τρυβλία τα οποία περιείχαν 10 mL πλήρες θρεπτικό. Στον πρώτο διαμοιρασμό τα κύτταρα ενός τρυβλίου διαμοιράστηκαν σε 3 νέα τρυβλία, ενώ στο δεύτερο διαμοιρασμό σε δύο.

2.3.1.1.3 Διατήρηση κυττάρων

Η μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων είναι δυνατή με την τοποθέτησή τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Για τη διατήρηση και βαθιά κατάψυξη των κυττάρων επιλέχθηκαν τρυβλία, τα οποία είχαν σχηματίσει πλήρες ταπήτιο (πυκνότητα περίπου 80 %) και ακολουθήθηκε η διαδικασία της παραγράφου 2.3.1.2 για τη συλλογή των κυττάρων. Το ίζημα των κυττάρων ενός corning εναιωρήθηκε σε 1900 µL πλήρες θρεπτικό υλικό και 100 µL DMSO. Σε δύο αμπούλες (cryovials) των 2 mL τοποθετήθηκε από 1 mL εναιωρήματος κυττάρων. Οι αμπούλες μεταφέρθηκαν στους -80 °C.

2.3.1.2 Βιοχημικά κριτήρια

2.3.1.2.1 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των επιλεγμένων εκχυλισμάτων σε κύτταρα A549 με κυτταρομετρία ροής

Όταν ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης η φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μεταφέρεται στην εξωτερική. Η Annexin V είναι μία πρωτεΐνη,. Δεσμεύεται με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως η

φωσφατιδυλοσερίνη παρουσία ιόντων Ca^{+2} (Van Engeland et al. 1996) και παρουσιάζει εξειδίκευση στην απόπτωση. Η Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) είναι φθοριόχρωμα. Σήμανση των κυττάρων με Annexin V-FITC επιτρέπει την αναγνώριση αποπτωτικών κυττάρων σε ένα πρώιμο στάδιο απόπτωσης, ενώ η σήμανση των κυττάρων με ιωδιούχο προπίδιο (P.I.) είναι δείκτης της νέκρωσης των κυττάρων. Η κυτταρομετρία ροής είναι μία αναλυτική τεχνική που επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων. Μία ροή υγρού (sheath fluid) μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από μία δέσμη φωτός λέιζερ. Με κατάλληλους ανιχνευτές καταγράφονται σήματα πρόσθιας (FSC), πλάγιας (SSC) σκέδασης και σήματα φθορισμού.

Προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη, που σχετίζονται με τα αρχικά στάδια της απόπτωσης, τα κύτταρα σημάνθηκαν με ανεξίνη (Annexin V-FITC) ενώ τα νεκρά κύτταρα σημάνθηκαν με Ιωδιούχο προπίδιο (P.I.). Τα κύτταρα αναλύθηκαν σε ένα FAC Scan Becton Dickinson κυτταρόμετρο ροής.

2.3.1.2.1.1 Επίστρωση τρυβλίων με A549 κύτταρα

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία των 45 mm επιστρωμένα με πληθυσμό 10^6 κύτταρα/τρυβλίο τα οποία καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 48 ώρες. Για να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να παραμείνουν όλα στο ίδιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από μη πλήρες θρεπτικό (χωρίς ορό FBS). Στο μη πλήρες θρεπτικό είχαν διαλυθεί ή προστεθεί τα υπό εξέταση φυτικής προέλευσης συστατικά και τα κύτταρα επώσθηκαν με το υπό εξέταση ερέθισμα για 24 ώρες.

- **Διαλύματα εργασίας**

- Trypan blue 10 % σε H_2O

- 900 μL H_2O μεταφέρθηκαν σε erendorf και προστέθηκαν 100 μL Trypan blue.

Μετά το 2^ο διαμοιρασμό και επώαση των κυττάρων ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με εκείνη της παραπάνω παραγράφου (§ 2.3.1.1.2). Για την καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε συγκεκριμένο όγκο αιωρήματος χρησιμοποιήθηκε αιματοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber).

Σε erendorf μεταφέρθηκαν 90 μL χρωστικής Trypan blue 10% και 10 μL από το εναιώρημα των κυττάρων. 10 μL από το παραπάνω εναιώρημα τοποθετήθηκαν στο αιματοκυτταρόμετρο. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x400). Τα νεκρά κύτταρα βάφονται

μπλέ, ενώ τα ζωντανά κύτταρα έχουν σφαιρικό σχήμα και λαμπυρίζουν. Μετρήθηκαν τα κύτταρα σε δύο διαγώνια τετράγωνα από το σταυρό. Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Αριθμός κυττάρων /mL} = A \cdot 10^4$$

Όπου:

A: Ο μέσος όρος των κυττάρων που μεταφέρθηκαν

Λ: Αραίωση του διαλύματος της χρωστικής

10⁴: Συντελεστής διόρθωσης του όγκου του υγρού που συγκρατήθηκε στο αιματοκυτταρόμετρο.

Γνωρίζοντας τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε 1 mL αιωρήματος, υπολογίστηκε η ποσότητα του αιωρήματος σε mL που θα έπρεπε να μεταφερθεί σε τρυβλία των 45 mm με 5 mL πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα ανά τρυβλίο.

Τα κύτταρα στο σωληνάριο εναιωρήθηκαν, λήφθηκε η ποσότητα που υπολογίστηκε και μεταφέρθηκε στο τρυβλίο. Τα τρυβλία με τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρώς, παρατηρήθηκαν στο ανάστροφο μικροσκόπιο και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο για 48 ώρες.

2.3.1.2.1.2 Εφαρμογή εκχυλισμάτων

48 ώρες μετά την επίστρωση των τρυβλίων με $1 \cdot 10^6$ κύτταρα το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου, αφού απομακρύνθηκε το πλήρες θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση, προστέθηκαν 5 mL μη πλήρες θρεπτικό υλικό με το υπό εξέταση ερέθισμα (παράγραφος). Για κάθε ερέθισμα πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις.

2.3.1.2.1.3 Απομόνωση κυττάρων

24 ώρες μετά την εφαρμογή του ερεθίσματος τα τρυβλία παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο και τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή Nikon (μεγέθυνση x400). Το υπερκείμενο των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωληνάκια (Corning) και φυγοκεντρήθηκε στις 2.000 για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με αναρρόφηση ιδιαίτερα προσεκτικά, ώστε να μην απομακρυνθεί ίζημα κυττάρων. Τα κύτταρα στα τρυβλία θρυψινοποιήθηκαν με 1 mL διαλύματος Trypsin-EDTA και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο 37 °C, 5% CO₂ για 10 min. Στη συνέχεια τα τρυβλία ανακινήθηκαν ελαφρώς και ακολούθησε αδρανοποίηση της θρυψίνης με 1 mL PBS. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στο corning που περιείχε το ίζημα του υπερκείμενου. Έπειτα από ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 2.000 rpm για 5 min το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν

άλλες δύο (2) φορές με 2 mL ψυχρού διαλύματος PBS. Τα corning με το ίζημα των κυττάρων τοποθετήθηκαν σε πάγο και ακολούθησε το επόμενο στάδιο της σήμανσης με Annexin V-FITC και PI.

2.3.1.2.1.4 Κυτταρομετρία ροής

- **Διαλύματα εργασίας**

- Ψυχρό PBS

- Το διάλυμα PBS διατηρείται σε πάγο

- Διάλυμα Binding buffer 1:9 σε PBS

- Υπολογίζεται η ποσότητα του διαλύματος, η οποία θα χρειαστεί για την ανάλυση των δειγμάτων, λαμβάνοντας υπόψη ότι θα χρειαστούν 1.400 μL /δείγμα. Το διάλυμα προετοιμάζεται με την ανάμιξη ενός (1) μέρους Binding buffer σε εννέα (9) μέρη PBS.

Το ίζημα των κυττάρων της προηγούμενης παραγράφου εναιωρήθηκε σε 1mL διαλύματος binding buffer (10^6 κύτταρα mL^{-1}). 100 μL από το εναιώρημα τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι flow. Προστέθηκαν 5 μL Annexin-V FITC και 5 μL PI. Ακολούθησε ελαφριά ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 min στους 25 °C. Προστέθηκαν άλλα 400 μL binding buffer και ακολούθησε ανάλυση των κυττάρων με το κυτταρόμετρο ροής.

Τα αποτελέσματα βασίστηκαν στην μέτρηση 10.000 κυττάρων. Ο συνδυασμός σήμανσης με Annexin-V FITC και PI επιτρέπει τη διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων σε ένα πρώιμο στάδιο της απόπτωσης (Annexin-V FITC⁺), των νεκρών κυττάρων (PI⁺), των κυττάρων που ενώ έχει ενεργοποιηθεί η απόπτωση έχουν δευτερογενώς υποστεί νέκρωση (όψιμων αποπτωτικών) (Annexin-V FITC⁺ και PI⁺) και των ζωντανών κυττάρων (Annexin-V FITC⁻ και PI⁻).

Υπολογίστηκαν ο κυτταρικός θάνατος %, το ποσοστό της συνολικής απόπτωσης% ως εξής:

- **Κυτταρικός θάνατος %** = Νεκρά % + Πρώιμα αποπτωτικά % + Όψιμα αποπτωτικά %
- **Συνολική απόπτωση %** = Πρώιμα αποπτωτικά % + Όψιμα αποπτωτικά %

2.3.1.2.1.4.1 Στατιστική ανάλυση – αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS, version 8. Πραγματοποιήθηκε απλή ανάλυση διασποράς (one way Anova) και για τη σύγκριση του μέσου όρου των επεμβάσεων με τον μέσο όρο του μάρτυρα, για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($P < 0.05$), χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Dunnett's.

2.3.1.2.2 Διαλύματα εφαρμογής

Τα βιοδραστικά συστατικά παραλήφθηκαν με τη μέθοδο της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων (§ 2.2.5.1) και τη μέθοδο της υδροαπόσταξης (§ 2.2.5.2).

2.3.1.2.2.1 Προκαταρκτικά πειράματα

Με τα προκαταρκτικά πειράματα διερευνήθηκε η χρήση διαφορετικών διαλυτών για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών και η κατάλληλη μέθοδος για την εφαρμογή τους

2.3.1.2.2.1.1 Πρώτο προκαταρκτικό πείραμα: Προετοιμασία διαλυμάτων εφαρμογής

Για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (μεθανόλη, εξάνιο, χλωροφόρμιο, d H₂O με 10% Μεθανόλη). 2 mL εκχυλίσματος 10% (100 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹ εκχυλίσματος) μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Το εκχύλισμα αποξηράνθηκε σε ατμόσφαιρα αζώτου N₂ και θερμοκρασία 40 °C, αναδιαλύθηκε σε 10 mL μη πλήρες θρεπτικό υλικό Ham's F12K και εφαρμόστηκε σε τρυβλία των 45 mm στρωμένα με 1 x 10⁶ A549 κύτταρα. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα αντιστοιχούσε σε 20 mg ξηρού φυτικού υλικού ανά mL μη πλήρους θρεπτικού υλικού (20 mg mL⁻¹). Ο μάρτυρας δέχθηκε την επίδραση μόνο του θρεπτικού υλικού. Για την εφαρμογή του αιθέριου ελαίου παρασκευάστηκε διάλυμα αιθέριου ελαίου περιεκτικότητας 10% σε DMSO και από αυτό με αραιώση διάλυμα αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 0,05 μL mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού το οποίο εφαρμόστηκε στα κύτταρα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0,45 μL mL⁻¹ DMSO σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

2.3.1.2.2.1.1.1 Δοκιμές διαλυτότητας

Λόγω της κακής αναδιάλυσης των αποξηραμένων εκχυλισμάτων εξανίου και χλωροφορμίου στο θρεπτικό υλικό ελέγχθηκε η διαλυτότητά τους σε MeOH και DMSO. Η παρουσία MeOH και DMSO σε συγκέντρωση 5% είναι ανεκτή από τα κύτταρα.

2.3.1.2.2.1.2 Δεύτερο προκαταρκτικό πείραμα: Εναλλακτικός τρόπος εφαρμογής των εκχυλισμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα εξανίου, χλωροφορμίου και μεθανόλης. Τα συμπυκνωμένα και αποξηραμένα σε ατμόσφαιρα N₂ εκχυλίσματα αναδιαλύθηκαν σε DMSO (4.000 mg mL⁻¹). Με προσθήκη 25 μL από το διάλυμα αυτό σε 5mL θρεπτικό προετοιμάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 20 mg mL⁻¹ θρεπτικού υλικού. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DMSO συγκέντρωσης 5 μL

mL⁻¹ θρεπτικού. Για την διερεύνηση της επίδρασης του DMSO (5 mL mL⁻¹ θρεπτικού) ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μη πλήρες θρεπτικό υλικό Ham's F12K.

2.3.1.2.2.2 Κυρίως πειράματα

Για τις ανάγκες του πειραματισμού διερευνήθηκε η ικανότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των επιλεγμένων φυτικών ειδών να επάγουν τον μηχανισμό της απόπτωσης σε A549 κύτταρα.

2.3.1.2.2.2.1 Πείραμα 1ο: Πρώτη διερεύνηση (screening) της επίδρασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα 10% (100 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹ MeOH) των επιλεγμένων φυτικών ειδών και προετοιμάστηκαν διαλύματα εφαρμογής συγκέντρωσης 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού (§ 2.3.1.2.2.1.1). Τα εκχυλίσματα, πριν την εφαρμογή τους στα κύτταρα, φυγοκεντρήθηκαν σε 3.500 rpm για τον διαχωρισμό των στερεών συστατικών από την υγρή φάση. Για τον μάρτυρα ακολουθήθηκε ή ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας μόνο διαλύτη (MeOH). Για να μελετηθεί η επίδραση της μεθανόλης (MeOH) στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μη πλήρες θρεπτικό υλικό Ham's F12K.

2.3.1.2.2.2.2 Πείραμα 2ο: Δοσοεξαρτώμενα πειράματα μεθανολικών εκχυλισμάτων σε A549 κύτταρα

Από το μεθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 10% (100 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹ MeOH) προετοιμάστηκαν με αραιώση διαλύματα συγκέντρωσης 10-20-30-50 mg mL⁻¹ σε MeOH. Τα διαλύματα προετοιμάστηκαν, όπως στην παραπάνω παράγραφο (§2.3.1.2.2.1.1) και παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0-2-4-6-10-20 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού υλικού. Για το είδος *O. vulgare* spp. *hirtum* προετοιμάστηκαν ανάλογα και εφαρμόστηκαν στα κύτταρα διαλύματα συγκέντρωσης 0-0,5-1-2,5-5-10-20 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹ θρεπτικού. Για το εκχύλισμα φύλλων του *H. cyclophyllus* προετοιμάστηκαν αρχικά διαλύματα συγκέντρωσης 6 και 10 mg mL⁻¹ και στη συνέχεια διαλύματα συγκέντρωσης 0 -100-200-400-600-900-1250 μg mL⁻¹ θρεπτικού υλικού.

2.3.1.2.2.2.3 Πείραμα 3ο: Διερεύνηση της βιοδραστικότητας αιθέριου ελαίου σε A549 κύτταρα

Παρασκευάστηκε διάλυμα αιθέριου ελαίου περιεκτικότητας 10% σε DMSO και από αυτό, με αραιώση διάλυμα αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 0,05 mL mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού, το οποίο εφαρμόστηκε στα κύτταρα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0,45 mL mL⁻¹ DMSO. Για το αιθέριο έλαιο του είδους *O. vulgare* spp. *hirtum* χρησιμοποιήθηκε δεκαπλάσια

συγκέντρωση $0,5 \text{ mL mL}^{-1}$ μη πλήρους θρεπτικού. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης 20 mg mL^{-1} σε A549 κύτταρα και τις μετρήσεις που αφορούν την περιεκτικότητα του φυτικού ιστού σε αιθέριο έλαιο.

2.3.1.2.3 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωση κατά Western blot

2.3.1.2.3.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση *S. horvatii* spp. *macrophylla* και *H. cyclophyllus*.

2.3.1.2.3.1.1 Λύση κυττάρων με υπερήχηση

A549 κύτταρα τα οποία δέχθηκαν την επίδραση 10 mg mL^{-1} και 20 mg mL^{-1} *S. horvatii* spp. *macrophylla*, 0 για 24 και 48 h χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πρωτεϊνών. Τα κύτταρα απομακρύνθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου με μηχανικό τρόπο (χρήση scraper) και αφού φυγοκεντρήθηκαν σε 3500 rpm, για 10 min, ξεπλύθηκαν δύο (2) φορές με PBS. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 300-400 μL PBS. Τα κύτταρα αφού μεταφέρθηκαν σε ependorf, το οποίο τοποθετήθηκε σε πάγο, ομογενοποιήθηκαν με υπερήχους ($3 \times 10 \text{ sec}$) και τοποθετήθηκαν στους -80°C .

A549 κύτταρα τα οποία δέχθηκαν την επίδραση 10 mg mL^{-1} και 20 mg mL^{-1} *S. horvatii* spp. *macrophylla*, 0,1, 0,6 και 6 mg mL^{-1} *H. cyclophyllus* για 24 και 48 h χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πρωτεϊνών.

2.3.1.2.3.1.2 Λύση κυττάρων με RIPA buffer

- **Διαλύματα εργασίας**

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl PH=7.4 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxychlorate, 0,1% SDS

Working RIPA buffer

Στο RIPA buffer προστέθηκαν οι αναστολείς των προτεασών 1%. Σε 100 μL RIPA προστέθηκε 1 μL προτεασών

- **Πειραματική πορεία**

A549 κύτταρα τα οποία δέχθηκαν την επίδραση $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$, 6 mg mL^{-1} και 0 mg mL^{-1} *H. Cyclophyllus* για 24 και 48 h χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πρωτεϊνών. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με scraper. Το περιεχόμενο δύο τρυβλίων μεταφέρθηκε σε corning των 10 mL.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 10 min. Το ίζημα των κυττάρων εκπλύθηκε δύο φορές με ψυχρό PBS και αφού επαναιωρήθηκε σε 1 mL PBS μεταφέρθηκε σε ependorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 3500 rpm για 10 min, απόχυση του υπερκείμενου και τοποθέτηση των ependorf στον πάγο. Σε κάθε ependorf προστέθηκαν 500 µL RIPA working . Το ίζημα επαναιωρήθηκε επιμελώς με πιπέτα και στη συνέχεια τα ependorf παρέμειναν στον πάγο για 5 min. Τα ependorf φυγοκεντρήθηκαν σε 12.500 rpm και θερμοκρασία 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό ependorf και ακολούθησε ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης. Στο ίζημα προστέθηκαν 250 µL Sample buffer (1X).

2.3.1.2.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford (1976) βασίζεται στην προσθήκη της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε διάλυμα πρωτεϊνών. Η ελεύθερη χρωστική σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm, αλλά όταν προσδένεται σε πρωτεΐνη η απορρόφηση μετατοπίζεται στα 595 nm. Σύμφωνα με μελέτες η ελεύθερη χρωστική μπορεί να υπάρχει σε 4 διαφορετικές μορφές ιονισμού για τις οποίες οι τιμές της pKa είναι 1.15, 1.82, και 12.4. Το μεγαλύτερο ποσοστό από τις κατιονικές κόκκινες και πράσινες μορφές της χρωστικής, οι οποίες επικρατούν στο διάλυμα αντίδρασης της όξινης χημικής δοκιμής, έχουν μέγιστη απορρόφηση στα 470 και 650 nm αντίστοιχα. Σε αντίθεση το μεγαλύτερο ποσοστό της ανιοντικής μπλε μορφής της χρωστικής, η οποία δεσμεύεται στην πρωτεΐνη, έχει μια μέγιστη απορρόφηση στα 590 nm (Kruger 2009). Έτσι η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί με τον ποσοτικό προσδιορισμό της χρωστικής σε μπλε ιοντική μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται έπειτα από μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 595 nm.

- **Διαλύματα εργασίας**

Διάλυμα 16.3 N αιθανόλης

95 ml απόλυτης αιθανόλης αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 100 mL σε νερό.

Διάλυμα χρωστικής

100 mg Coomassie Blue G-250 διαλύονται σε 50 ml 95 % v/v αιθανόλης. Στο διάλυμα προστίθενται 100 mL 85 % v/v H₃PO₄. Το διάλυμα αραιώνεται στα 200 ml με νερό και διηθείται σε χάρτινο ηθμό Whatman. Η μπλε χρωστική διατηρείται σε σκουρόχρωμη γυάλινη φιάλη στους 4 °C για αρκετές εβδομάδες.

Πρότυπο διάλυμα 1 mg mL⁻¹ αλβουμίνης σε δις απεσταγμένο νερό (BSA stock)

50 mg BSA διαλύονται σε 40 ml δις απεσταγμένο νερό υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο 37 °C. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό. Το απόθεμα (stock) διάλυμα φυλάσσεται στους –20 °C.

Διάλυμα εργασίας 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ αλβουμίνης σε δις απεσταγμένο νερό (BSA working solution)

Ογκομετρική φιάλη των 50 mL, που περιέχει 35 mL περίπου δις απεσταγμένο νερό, τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C και προστίθενται 1.25 mL διαλύματος αλβουμίνης 1 mg mL⁻¹. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με δις απεσταγμένο νερό. Φυλάσσεται στους –20 °C.

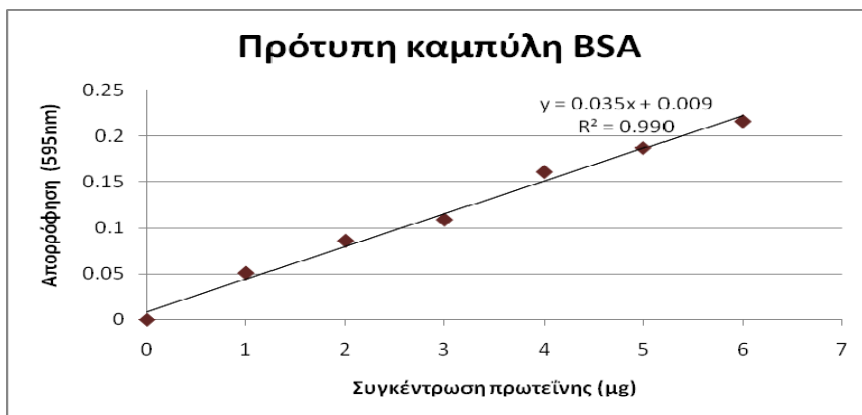
Working RIPA buffer

Στο RIPA buffer προστέθηκαν οι αναστολείς των πρωτεασών 1%. Σε 100 μL RIPA προστέθηκε 1 μL πρωτεασών.

- **Πειραματική πορεία**

Για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα είναι απαραίτητη η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προετοιμάζεται με τον προσδιορισμό της BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σε erendorf προστίθενται 0, 40, 80, 120, 160, 200 και 240 μL πρότυπου διαλύματος BSA 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ο όγκος συμπληρώνεται στα 800 μL με απεσταγμένο νερό και προστίθενται 200 μL χρωστικής και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης στο άγνωστο δείγμα 10 μL μεταφέρονται σε erendorf και ακολουθεί η ίδια διαδικασία. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται 5 min μετά την προσθήκη της χρωστικής στα 595 nm.

Στην περίπτωση που η λύση των κυττάρων είχε πραγματοποιηθεί με RIPA buffer προστέθηκαν στα πρότυπα διαλύματα 2 μL διαλύματος working RIPA buffer. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης στο άγνωστο δείγμα 2 μL δείγματος μεταφέρθηκε στο erendorf και ακολούθησε η ίδια διαδικασία.



Εικόνα 27: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA

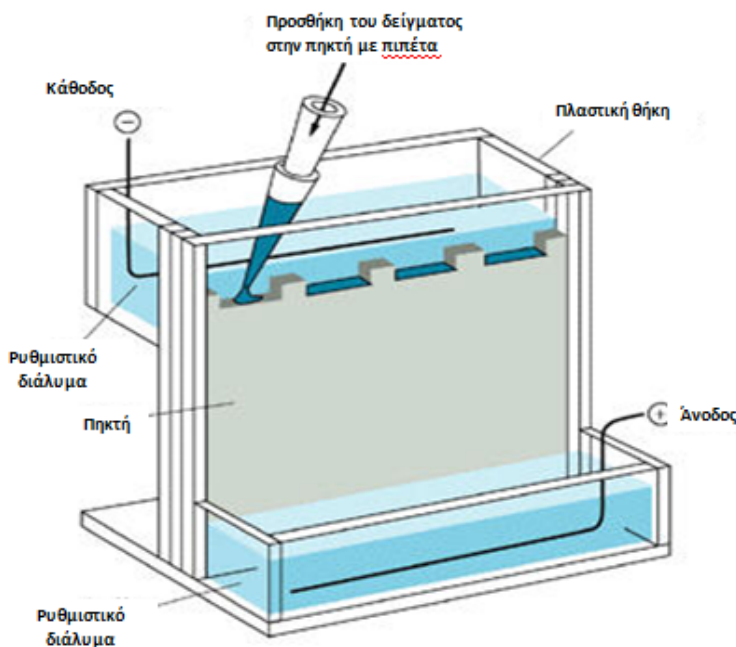
- **Επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Από τις απορροφήσεις των προτύπων και την περιεκτικότητά τους σε αλβουμίνη χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς σε γράφημα (Excel) και υπολογίζεται η εξίσωση της βέλτιστης ευθείας με μορφή $y=ax+b$ (**Εικόνα 27**). Με βάση την καμπύλη υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση πρωτεϊνών ανά mL δείγματος.

2.3.1.2.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS)

Ηλεκτροφόρηση λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω ενός φορέα (Γεωργάτσος κ.ά. 2004). Η ταχύτητα μετακίνησης της πρωτεΐνης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής (Γεωργάτσος κ.ά. 2004, Styer 1991).

Με την ηλεκτροφόρηση (**Εικόνα 28**) σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SDS (SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (μετουσίωσης) μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη μάζα τους. Οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με ηλεκτραρνητικά μόρια του δωδεκυλο-θειικού νατρίου (SDS) και μεταναστεύουν ως ένα ηλεκτραρνητικό σύμπλοκο δια μέσου μιας πορώδους πηκτής πολυακρυλαμίδης (Alberts et al. 2000).



Εικόνα 28: Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Πηγή: Alberts 2000)

Ένας αναγωγικός παράγοντας (μερκαπτοαιθανόλη) προστίθεται συνήθως για να διασπαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί της πρωτεΐνης (Alberts et al. 2000, Stryer 1991). Τα μόρια, τα οποία είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδιακρυλαμιδίου στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής (Stryer 1991). Η μετακίνηση του συμπλόκου SDS-πολυπεπτιδίων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων της συσκευής.

- **Διαλύματα εργασίας**

- 30 % Ακρυλαμίδιο / 0.8 % Bis-ακρυλαμίδιο

- 292,2 g ακρυλαμιδίου (4.22 M) και 0.8 g δις-ακρυλαμιδίου (5.19 mM) διαλύονται με νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C.

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1.5 M Trizma base pH 8.8 (Resolving gel separating buffer)

- 18.2 g Trizma base διαλύονται σε 100 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 8.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

- Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Trizma base pH 6.8 (Stacking gel buffer)

- Ζυγίζονται 6.0 g Trizma base και διαλύονται σε 100 ml νερού. Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6.8 με διάλυμα 4 N HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

- Διάλυμα 10% SDS (0.35 M)

- 10 g SDS και διαλύονται, με χαμηλή θέρμανση σε 100 mL (τελικός όγκος). Το διάλυμα φυλάσσεται για 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου.

- 10 % Διάλυμα Υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) (0.44 M)

- Ζυγίζονται 0.1 g υπερθειϊκού αμμωνίου και διαλύονται με νερό σε τελικό όγκο 1 mL. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x) (Running Buffer) 0.025 M Trizma base, 0.192 M γλυκίνης, 0.035 M SDS, pH 8.3

- 36 g Trizma base, 172,8 g γλυκίνης και 12 g SDS προστίθενται σε νερό και ρυθμίζεται το pH=8.3. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 1200 mL με νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στο σκοτάδι στους 4 °C για 3 μήνες.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x) (Running Buffer)

100 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x) μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη, συμπληρώνεται μέχρι τα 1000 mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 8.3.

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Sample Buffer) 50 mM Trizma base, 1 w/v % SDS, 10 % v/v γλυκερόλη, 2 % v/v μερκαπτοαιθανόλη, 0.01% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, pH 6.8

Αναμιγνύονται 0.3028 g Trizma base, 0.5 g SDS, 5 ml γλυκερόλης, 1 mL μερκαπτοαιθανόλης και 5 mg κυανού της βρωμοφαινόλης. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 50 mL με νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 6.8. Το διάλυμα χωρίζεται ανά 0.5 mL σε corning και φυλάσσονται στους -20°C .

Διάλυμα χρωματισμού 1 % w/v Coomassie Brilliant Blue R-250 (staining Buffer)

2 g Coomassie Blue R-250 διαλύονται σε 200 mL H_2O . Το διάλυμα αναδεύεται και διηθείται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διάλυμα χρωματισμού πυκτώματος

Αναμειγνύονται 250 mL μεθανόλης, 50 mL οξικού οξέος και 62,5 mL διαλύματος χρωματισμού 1% Coomassie Brilliant Blue R-250

• Πειραματική πορεία

Η Ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών με πηκτή αποτελούμενη από δύο μέρη (**Πίνακας 2**), την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) με μικρότερο μέγεθος πόρων και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) με μεγαλύτερο μέγεθος πόρων (αναλογία όγκων ~5:1). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλες θέσεις (Wells) που δημιουργήθηκαν στο επάνω μέρος της πηκτής. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη, συσσωρεύονται σε μία λεπτή στοιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή όπου γίνεται ο διαχωρισμός. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε πηκτή SDS-PAGE 15 % για τον προσδιορισμό της κασπάσης-3 και 8% για την πολυμεράση της πολύ-ADP ριβόζης (PARP).

Όγκος δείγματος περιεκτικότητας 20 μg σε πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε ependorf. Σε αυτό προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (sample buffer) ίσο με το ήμισυ του όγκου του δείγματος. Ο συνολικός όγκος ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 25-30 μL . Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 10 min, φορτώθηκαν στις κατάλληλες θέσεις του πηκτώματος με κατάλληλο ρύγχος και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε 150 V μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x Tris-

γλυκίνης που περιείχε SDS (running Buffer) για 1 με 1 1/2 ώρες. Ως δείκτης των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο μίγμα (marker) το οποίο τοποθετήθηκε στην πρώτη θέση κάθε πηκτής.

Πίνακας 2: Όγκοι πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης

Αντιδραστήρια	Πήκτωμα διαδρομής 8% (Resolving Buffer)	Πήκτωμα διαδρομής 10% (Resolving Buffer)	Πήκτωμα διαδρομής 12% (Resolving Buffer)	Πήκτωμα διαδρομής 15% (Resolving Buffer)	Πήκτωμα Επιστοίβαξης (Stacking Buffer)
H₂O	4.7	4.2 mL	3,4 mL	2,5	3,5 mL
0,5 M Tris PH 6,8					3 mL
15M Tris PH 8,8	2.5	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	
10% SDS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	80 µL
A/bis acrylamide	2.7 mL	3.4 mL	4 mL	5 mL	1.3 mL
10% Ammonium per sulfate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	80 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	8 µL

2.3.1.2.3.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot

Η ανοσοαποτύπωση κατά western είναι μια σημαντική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία. Με τη χρήση της ανοσοαποτύπωσης είναι δυνατός ο προσδιορισμός μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αφού διαχωριστούν κατά μέγεθος με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτής πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται και αποτυπώνονται σε κατάλληλη μεμβράνη. Η πρωτεΐνη-στόχος σημαίνεται με τη χρήση ειδικού αντισώματος (πρωτεύον) (Mahmood & Yang 2012). Ένα δευτερεύον αντίσωμα προστίθεται για να εντοπίσει τις θέσεις δέσμευσης του πρωτεύοντος αντισώματος και τα συμπλόκα αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύονται μέσω αντίδρασης χημειοφωταύγειας.

- **Διαλύματα εργασίας**

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών 192 mM γλυκίνης, 25 mM Trisma-Base, 1.3 mM SDS (Transfer buffer)

7.2 g γλυκίνης, 1.5 g Tris-Base, 5 mL 10 % v/v SDS και προστίθενται σε 400 mL H₂O (τελικός όγκος) και αναδεύονται. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 ml με την προσθήκη 100 mL MeOH. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

Διάλυμα έκπλυσης (10x) TBS 0.2 M Trizma-base, 1.4 M NaCl (stock solution)

24.2 g Trizma-Base, 80 g NaCl Προστίθενται σε νερό συνολικού όγκου 1 L και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7.6. Φυλάσσεται στους 4 °C.

Διάλυμα έκπλυσης TBS (1x) με 0.1 % Tween-20 (διάλυμα εργασίας TBST)

100 ml διαλύματος 10xTBS αραιώνονται στο 1 L με dd H₂O και προστίθεται 1 mL Tween-20. (αναστολέας πρωτεασών). Φυλάσσεται στους 4 °C.

Διάλυμα δέσμμευσης πρωτεϊνών 5 % w/v σε γάλα (blocking solution)

5 g σκόνης αποβουτυρωμένου γάλακτος εμπορίου διαλύονται σε 100 ml TBST και ρυθμίζεται το PH στο 7.6. Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Διάλυμα εργασίας χημειοφωταύγειας

Τα δύο (2) διαλύματα χημειοφωταύγειας αναμιγνύονται σε corning (αναλογία 1:1 v/v). Το διάλυμα ετοιμάζεται λίγο πριν τη χρήση.

Διάλυμα εργασίας εμφάνισης του φιλμ (Development)

50 mL διαλύματος αραιώνεται σε νερό (200 ml συνολικός όγκος). Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας στερέωσης του φιλμ (Fixer)

50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνεται με νερό (200 mL συνολικός όγκος). Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας πρωτεύοντος αντισώματος caspase -3

20 μL μονοκλωνικού αντισώματος αραιώθηκαν σε 10 ml διαλύματος TBST (αραίωση 1:500). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα εργασίας δευτερεύοντος αντισώματος

1 μL αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 10 mL διαλύματος TBST (αραίωση 1:10000). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

Διάλυμα εργασίας αντισώματος β-ακτίνης

1 μL αντισώματος αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου με 7 mL διαλύματος TBST (αραίωση 1:500). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20 °C.

- **Πειραματική πορεία**

Τέσσερα χαρτιά Whatman και δύο λεπτά φύλλα διηθητικού χαρτιού, κομμένα στις διαστάσεις του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, εμποτίστηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer 1x). Μembrάνη PVDF (πολυβινυλιδιαινικό φθορίδιο) κόπηκε στις διαστάσεις του πηκτώματος και αφού διαβράχθηκε με MeOH εμβαπτίστηκε πλήρως σε H₂O και στη συνέχεια στο Transfer Buffer (1x). Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, μεταφέρθηκε σε Transfer Buffer (1x) αφού απομακρύνθηκε το πήκτωμα επιστοίβασης.

Στην ειδική συσκευή μεταφοράς (Hoffer TE70, Amersham Bioscience) τοποθετήθηκαν με τη σειρά. Δύο (2) φύλλα Whatman, ένα (1) λεπτό φύλλο διηθητικό χαρτί, η μεμβράνη, το πήκτωμα που έχει τρέξει η ηλεκτροφόρηση, ένα (1) λεπτό φύλλο διηθητικό χαρτί και δύο (2) φύλλα Whatman. Η επιστροφή έγινε με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες σε κανένα σημείο του sandwich. Για δύο μεμβράνες η ηλεκρομεταφορά πραγματοποιήθηκε στα 150 mA για 2 h.

Μετά τη μεταφορά τα πηκτώματα μεταφέρθηκε σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 προκειμένου να ελεγχθεί αν η μεταφορά των πρωτεϊνών ήταν επιτυχής. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε διάλυμα δέσμησης 5% (Blocking solution) υπό συνεχή ανάδευση overnight στους 4 °C προκειμένου να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων. Μετά την επώαση το διάλυμα απορρίφτηκε και ακολούθησαν 3 διαδοχικές εκπλύσεις με TBST για 10 min. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα, υπό συνεχή ανάδευση, για 4 h στους 4 °C και αφού εκπλύθηκαν 3 φορές για 10 min με TBST, εκτέθηκαν στο δεύτερο αντίσωμα (goat-anti mouse IgG-HRP) σε αναλογία 1:10.000 για 1.5-2 ώρες. Μετά από 3 δεκάλεπτες πλύσεις με TBST οι μεμβράνες επώαστηκαν για 5 min με το μίγμα χημειοφωταύγειας (ECL) και αφού τοποθετήθηκαν στην ειδική κασετίνα εμφάνισης μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο. Φίλμ (κομμένο σε ίδιες διαστάσεις) τοποθετήθηκε στις μεμβράνες για περίπου 9 min. Έπειτα απομακρύνθηκε, και τοποθετήθηκε στο διάλυμα εμφάνισης (Developer) έως ότου εμφανιστούν ζώνες. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκε στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) του φίλμ και αφού ξεπλύθηκε με νερό αφέθηκε να στεγνώσει. Για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων η μεμβράνη επώαστηκε overnight με το πρωτεύον αντίσωμα β-ακτίνης σε αναλογία 1:500 και ακολούθησε η ανίχνευση του αντισώματος και η εμφάνιση του φίλμ όπως προαναφέρθηκε.

2.3.1.3 Έλεγχος μορφολογίας κυττάρων

Οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις των A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλισμάτων των *S. horvatii* spp., *macrophylla* και *H. cyclophyllus* παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά (Εργαστήριο

Παθολογοανατομίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) έπειτα από χρώση αιματοξιλίνης – ηωσίνης και χρώση May Grünwald- Giemsa σε χρονοεξαρτώμενο πείραμα για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο βαθμός συμπύκνωσης του DNA των αποπτωτικών κυττάρων και ο σχηματισμός μικροπυρήνων παρατηρήθηκε έπειτα από χρώση DAPI σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), ενώ ο σχηματισμός κυστιδίων με λιπαρά συστατικά (*H. cyclophyllus*) ελέγχθηκε έπειτα από χρώση Oil red O.

Με τη χρώση αιματοξιλίνης – ηωσίνης είναι δυνατή η παρατήρηση, σε καλά στερεωμένα κύτταρα, σημαντικής ενδοκυτταρικής λεπτομέρειας. Η αιματοξυλίνη διαθέτει βαθύ μπλε- μωβ χρώμα και βάφει τα νουκλειακά οξέα, ενώ η ρόδινη ηωσίνη βάφει τις πρωτεΐνες μη ειδικά. Οι πυρήνες των κυττάρων αποκτούν έπειτα από χρώση αιματοξιλίνης-ηωσίνης μπλε χρώμα, ενώ το κυτταρόπλασμα διάφορες αποχρώσεις του ρόδινου. Η χρώση του πυρήνα με αιματοξυλίνη δίνει πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο συμπυκνώνεται η ετεροχρωματίνη, κάτι που είναι διαγνωστικά πολύ σημαντικό (Fisher et al. 2006).

Η χρώση May Grünwald- Giemsa χαρακτηρίζεται ως πανοπτική επειδή βάφει όλα τα κυτταρικά συστατικά. Το μπλε του μεθυλενίου βάφει μπλε τα όξινα συστατικά του κυττάρου, το κυανό (azure) βάφει κόκκινα και μωβ τα βασικά κυτταρικά συστατικά και η ηωσίνη βάφει πορτοκαλί-κόκκινα τα αλκαλικά συστατικά του κυττάρου.

Η DAPI είναι μία φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται αποκλειστικά με αλληλουχίες της ελάχιστονης αλυσίδας του DNA, οι οποίες είναι πλούσιες σε αδερίνη και θυμίνη (Karuscinski J., 1995). Στη μικροσκοπία φθορισμού διεγείρεται από υπεριώδες φως και εμφανίζει μπλε φθορισμό. Η χρωστική διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση τόσο ζωντανών όσο και μονιμοποιημένων κυττάρων.

Για να διερευνηθεί η επιλεκτικότητα των επιλεγμένων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε μορφολογικός έλεγχος, έπειτα από χρώση Παπανικολάου και DAPI, σε πνευμονικούς ινοβλάστες που δέχθηκαν την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων. Η χρώση Παπανικολάου είναι μία πολύχρωμη χρωστική μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει μία πυρηνική χρώση (αιματοξυλίνη) και δύο εξουδετερωτικές χρώσεις (Orange G και EA). Απαιτείται ενυδάτωση των μονιμοποιημένων επιχρισμάτων ώστε τα κύτταρα να απορροφήσουν την αιματοξυλίνη, ενώ η αφυδάτωση προετοιμάζει τα κύτταρα για να δεχθούν τις εξουδετερωτικές χρώσεις (www.eurocytology.eu)

2.3.1.3.1 Προετοιμασία μικροσκοπικών παρασκευασμάτων

2.3.1.3.1.1 Εφαρμογή εκχυλισμάτων (χρονοεξαρτώμενο – δόσοεξαρτώμενο πείραμα)

Καρκινικά κύτταρα A549 και πνευμονικοί ινοβλάστες επιστρώθηκαν σε τρυβλία των 5 mL και δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό μεθανολικών εκχυλισμάτων των *S. horvatii* spp. *macrophylla* και *H. cyclophyllus* στις παρακάτω συγκεντρώσεις:

- *S. horvatii* spp.. *macrophylla*: 10 mg mL⁻¹
- *S. horvatii* spp.. *macrophylla*: 20 mg mL⁻¹
- *H. cyclophyllus*: 0.1 mg mL⁻¹
- *H. cyclophyllus*: 0.6 mg mL⁻¹
- *H. cyclophyllus*: 6 mg mL⁻¹

Τα εκχυλίσματα εφαρμόστηκαν για 3, 6, 12, 24 και 48 ώρες (ανάλογα με τη χρώση και το είδος των κυττάρων). Ο μάρτυρας δέχθηκε την επίδραση μη πλήρους θρεπτικού υλικού.

2.3.1.3.1.2 Απομόνωση κυττάρων

Μετά την επίδραση τα κύτταρα απομονώθηκαν, όπως αναφέρεται στην παράγραφο (2.3.1.2.1.3), με τη διαφορά ότι τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3.200 rpm για 10 min και δεν πραγματοποιήθηκαν οι δύο τελευταίες εκπλύσεις με PBS.

2.3.1.3.1.3 Επίστρωση – στερέωση κυττάρων

Το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε στη σταγόνα που απέμεινε μετά την απόχυση του υπερκειμένου. Μία σταγόνα εναιωρήματος κυττάρων μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τα κύτταρα απλώθηκαν με τη βοήθεια καλυπτρίδας ώστε να δημιουργηθεί μονόστρωμη στρώση κυττάρων. Η καλυπτρίδα αφαιρέθηκε και τα κύτταρα στερεώθηκαν έπειτα από έκθεσή τους στον ατμοσφαιρικό αέρα.

2.3.1.3.2 Χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τα στερεωμένα κύτταρα εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 96 % για 1 sec και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1.5 sec και αφού ξεπλύθηκαν ξανά με νερό βρύσης εμβαπτίστηκαν 15 – 20 φορές σε διάλυμα ηωσίνης.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο (2) φορές με αιθυλική αλκοόλη 96%, δύο (2) φορές με ακετόνη και δύο (2) φορές με ξυλόλη και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα.

2.3.1.3.3 Χρώση Giemsa

Στην αντικειμενοφόρο πλάκα με τα στερεωμένα κύτταρα προστέθηκαν σταγόνες της χρωστικής May Grünwald μέχρι πλήρους καλύψεως. Μετά από 3 min προστέθηκε ίση ποσότητα νερού και το μίγμα χρωστικής – νερού αφέθηκε να δράσει για 1 min. Στη συνέχεια το μίγμα αποχύθηκε και προστέθηκε υδατικό διάλυμα Giemsa (4 σταγόνες Giemsa σε 2 mL νερού) μέχρι πλήρους καλύψεως. Η χρωστική αφέθηκε να δράσει για 5 min. Η αντικειμενοφόρος ξεπλύθηκε με νερό και αφού στέγνωσε, το παρασκεύασμα παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.3.1.3.4 Χρώση DAPI

- **Διαλύματα εργασίας**

Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3,7% σε PBS:

10 mL Φορμαλδεΰδης 37% προστέθηκαν σε 90 ml PBS.

Διάλυμα DAPI 1:1000 σε PBS

10 μ L Dapi (2 mg mL⁻¹) αναδιαλύθηκαν σε 10 mL PBS (αραίωση 1:1000). Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.

DAPI Διάλυμα εφαρμογής

20 μ L διαλύματος DAPI 1:1000 σε PBS αναδιαλύθηκαν σε 1mL PBS. Υπολογίστηκε η ποσότητα του διαλύματος που θα χρειαστεί για τη χρώση των παρασκευασμάτων. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -4 °C μέχρι τη χρήση του.

Antifade: 1mg mL⁻¹ p-Phenylenediamine σε 90% glycerol – 10 % 1XPBS

50 mg Phenylenediamine διαλύθηκαν σε 5 mL 10 x PBS. Στο διάλυμα προστέθηκαν 45 mL γλυκερόλης και ακολούθησε ανακίνηση για αρκετές ώρες σε ψυχρό θάλαμο (over night) στο σκοτάδι. Το διάλυμα διαμοιράστηκε σε ependorf και διατηρήθηκε στους -80 °C.

- **Πειραματική πορεία**

Στην αντικειμενοφόρο πλάκα με τα στερεωμένα κύτταρα προστέθηκαν σταγόνες διαλύματος παραφορμαλδεΰδης μέχρι πλήρους καλύψεως. Μετά από 10 min τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και προστέθηκαν σταγόνες της χρωστικής Dapi (διάλυμα εφαρμογής) μέχρι πλήρους καλύψεως. Μετά από 3 min ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων με PBS (3 φορές), προστέθηκε

antifade και τα κύτταρα καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Τα παρασκευάσματα φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Για τη διερεύνηση του φθορισμού που παρουσιάζουν τα συστατικά του *H. Cyclophyllus* μία σταγόνα MeOH εκχυλίσματος τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο, αποξηράνθηκε και παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού έπειτα από χρώση DAPI.

2.3.1.3.5 Χρώση Oil red O –Αιματοξυλίνης

- **Διαλύματα εργασίας**

Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3,7% σε PBS:

10 mL φορμαλδεΰδης 37% προστέθηκαν σε 90 mL PBS.

Διάλυμα Oil red O σε ισοπροπανόλη

300 mg Oil red O προστίθενται σε 100 mL ισοπροπανόλης. Το διάλυμα διατηρείται για 1 χρόνο.

Διάλυμα εφαρμογής Oil red O

Σε 30 mL του παραπάνω διαλύματος προστίθενται 20 mL απιονισμένο νερό. Μετά από παραμονή 10 min σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα διηθείται σε ηθμό Whatman και χρησιμοποιείται σε διάστημα 2 ωρών.

Ισοπροπανόλη 60%

Σε 40 mL 60 dd H₂O mL προστέθηκαν 40 mL ισοπροπανόλης 99.8%.

- **Πειραματική πορεία**

Έπειτα από επίδραση σε A549 κύτταρα με εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹ για 4 ώρες, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, φυγοκεντρήθηκε σε 12.500 rpm min⁻¹ και το ίζημα επιστρώθηκε όπως στην παράγραφο (2.3.1.3.1.3)

Στην αντικειμενοφόρο πλάκα με το στερεωμένο επίχρισμα προστέθηκαν σταγόνες διαλύματος παραφορμαλδεΰδης μέχρι πλήρους καλύψεως. Έπειτα από επώαση για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου, η φορμαλδεΰδη απομακρύνθηκε και αφού ξεπλύθηκε με dd H₂O το επίχρισμα καλύφθηκε με ισοπροπανόλη 60% για 2-5 min. Μετά την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης προστέθηκε το διάλυμα εφαρμογής του Oil red O μέχρι πλήρους καλύψεως για 5 min. Στη συνέχεια το επίχρισμα ξεπλύθηκε με νερό και καλύφθηκε με τη χρωστική της αιματοξυλίνης για 1 min. Ακολούθησε ξέπλυμα με ζεστό νερό, κάλυψη με DPX, τοποθέτηση καλυπτρίδας και παρατηρήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο.

Σε τρυβλίο των 2 mL στρώθηκαν 0.7×10^6 A549 κύτταρα και δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.6 και 6 mg mL⁻¹. Μετά από 24 ώρες επίδρασης το θρεπτικό αφαιρέθηκε και στα κύτταρα που απέμειναν στο ταπήτιο πραγματοποιήθηκε χρώση Oil red O-αιματοξυλίνης, όπως παραπάνω. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

2.3.1.3.6 Χρώση Παπανικολάου

Τα μικροσκοπικά παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε 96% αιθανόλη για 30 min, ενυδατώθηκαν με εμβάπτιση τους σε μία σειρά διαβαθμισμένων διαλυμάτων κατιούσας αλκοολών 80 %, 70% 50 % αιθανόλης και αφού εκλύθηκαν με απεσταγμένο νερό εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 min. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, εμβαπτίστηκαν σε όξινο διάλυμα 1%, εκπλύθηκαν σε νερό βρύσης, αφυδατώθηκαν μετά από εμβάπτισή τους σε μία σειρά διαβαθμισμένων διαλυμάτων ανιούσας αλκοολών 50%, 70%, 80%, 96% αιθανόλης και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 5 min σε διάλυμα Orange G (2 φορές). Ακολούθησε εμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης 96% και χρώση με EA 50 για 5min. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα εμβαπτίστηκαν σε 96 % αιθανόλη, σε διάλυμα 96% αιθανόλης- ξυλόλης 1:1, ξυλόλη και αφού τοποθετήθηκε μία σταγόνα DPX τα κύτταρα καλύφθηκαν με καλυπτρίδα.

2.3.2 Βιοδοκιμές σε φυτοπαθογόνους μύκητες

Διερευνήθηκε η επίδραση αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* σε ένα εδαφογενές φυτοπαθογόνο (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) και δύο είδη μυκήτων, οι οποίοι προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις σε καρπούς (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*), αλλά και προσβολές κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών της τομάτας με in vitro πειράματα. Για τις βιοδοκιμές που αφορούν το *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, χρησιμοποιήθηκε στέλεχος από την τράπεζα του Μπεννακείου φυτοπαθολογικού ινστιτούτου (Μ.Φ.Ι.). Στελέχη των μυκήτων *Alternaria alternata* και *Botrytis cinerea* απομονώθηκαν στο εργαστήριο από προσβλημένους καρπούς τομάτας. Για την ταξινόμηση των μυκήτων λήφθηκαν υπόψη τα συμπτώματα που εμφανίστηκαν στα προσβεβλημένα φυτικά όργανα, καθώς και η μορφή της αγενούς καρποφορίας (κονίδια και κονιδιοφόροι) των μυκήτων, η οποία παρατηρήθηκε μικροσκοπικά.

Η αντιμυκητική δράση του αιθέριου ελαίου εκτιμήθηκε με βάση τις τεχνικές:

- Μέθοδος διάχυσης με τη διάνοιξη βοθρίων σε εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υλικό.

- Μέθοδος εκτίμησης της επίδρασης των πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη του μυκηλίου.
- Μέθοδος ενσωμάτωσης σε στερεό μέσο.

Ως παράμετρος για την αξιολόγηση της αντιμυκητικής δράσης του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε η αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου (1^η μέθοδος) ή η ανάπτυξη του μυκηλίου (2^η, 3^η μέθοδος) για κάθε στέλεχος μυκήτων.

2.3.2.1 Απομόνωση και καλλιέργεια φυτοπαθογόνων μυκήτων

- **Διαλύματα εργασίας**

Στερεό Θρεπτικό υλικό DRBC ή PDA (1 L): Για την παρασκευή 1 L στερεού θρεπτικού υλικού DRBC ή PDA ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε γυάλινη φιάλη 31.6 g ή 42 g αντίστοιχα, προστέθηκε 1 L d H₂O, το διάλυμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε αυτόκαυστο για αποστείρωση στους 121 °C για 20 min. Μετά την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να κρυώσει αρκετά (περίπου 45 °C) και διαμοιράστηκε σε αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 10 cm.

- **Πορεία**

Καρποί τομάτας με εμφανή συμπτώματα προσβολής από μύκητες όπως κηλίδες φαντάσματα, νεκρωτικές κηλίδες και μυκηλιακές δομές συλλέχθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2011 από φυτά τομάτας τα οποία αναπτύχθηκαν με βιολογικό τρόπο. Οι προσβεβλημένοι καρποί τοποθετήθηκαν σε πλαστικό περιέκτη, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο φυτοπροστασίας, τμήμα τεχνολόγων γεωπονίας, όπου διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C.

Η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής κοντά σε φλόγα Bunsen και τη βοήθεια βελόνας μόλυνσης η οποία πυρακτώνονταν κάθε φορά, πριν την επαφή της με το παθογόνο, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Ακολούθησε απόξεση της προσβεβλημένης περιοχής του φυτού, εμβολιασμός τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα DRBC, σήμανση και επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 22 °C για όσο χρονικό διάστημα ήταν απαραίτητο ώστε ο μύκητας να σποροποιήσει και να καλύψει το 80 % του θρεπτικού υποστρώματος.

Τα εμβολιασμένα τρυβλία ελέγχονταν τακτικά για την καθαρότητα των καλλιεργειών. Στα τρυβλία που παρατηρήθηκαν μικτές καλλιέργειες έγινε διαχωρισμός των αποικιών και ανακαλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα DRBC ή PDF ώστε να δημιουργηθούν καθαρές αποικίες.

Τα τρυβλία με τις αποικίες των μυκήτων φωτογραφήθηκαν (Olympus) και προετοιμάστηκαν μικροσκοπικά παρασκευάσματα για την παρατήρηση των μικροσκοπικών τους χαρακτηριστικών τα οποία φωτογραφήθηκαν επίσης (Sony).

2.3.2.1.1 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό μέσο (Solid medium diffusion method)

Για μία πρώτη διερεύνηση της αντιμυκητικής δράσης αιθέριου ελαίου και μεθανολικού εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvatii* επιλέχθηκε η μέθοδος της διάχυσης με τη διάνοιξη βοθρίων σε εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υλικό (Souza *et al.* 2007). Η αντιμυκητική δράση εμφανίστηκε ως δακτύλιος αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης γύρω από τα βοθρία.

- **Διαλύματα εφαρμογής**

Διαλύματα αιθέριων ελαίων: Παρασκευάστηκε γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* με την προσθήκη 250 μL αιθέριου ελαίου και 250 μL DMSO σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 5 mL με την προσθήκη dd H_2O . Από το διάλυμα αυτό με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 2-4-6-8-10-15 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Η τελική συγκέντρωση όλων των διαλυμάτων σε DMSO ήταν 2% (Gonçalves *et al.* 2010).

Διαλύματα MeOH εκχυλίσματος: Από το μεθανολικό εκχύλισμα του *S. horvatii* συγκέντρωσης 10% (100 mg ξηρού φυτικού ιστού/ml MeOH) προετοιμάστηκαν με αραιώση διαλύματα συγκέντρωσης 50-40-30-20-10 mg mL^{-1} σε MeOH. 1 mL από τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Τα εκχυλίσματα αποξηράνθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου N_2 , αναδιαλύθηκαν σε 5 mL dd H_2O και παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 2-4-6-8-10-20 mg mL^{-1} . Πριν την εφαρμογή τους τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 rpm για τον διαχωρισμό των στερεών συστατικών από την υγρή φάση.

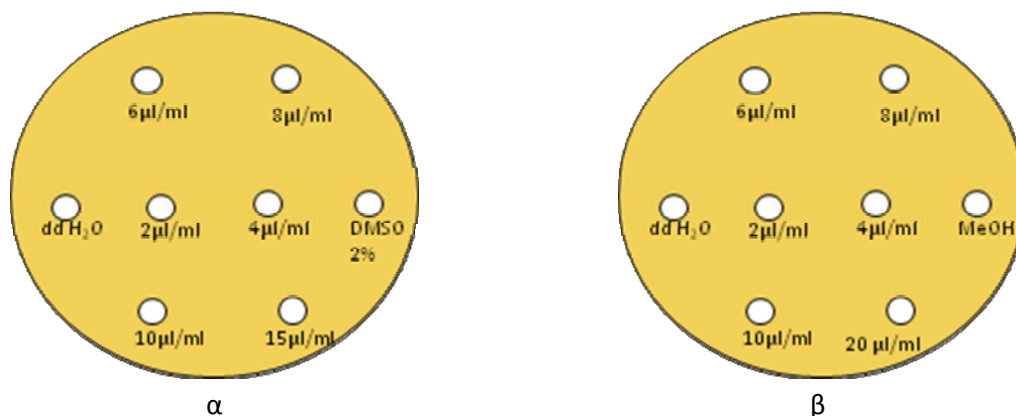
- **Πορεία**

Θρεπτικό υλικό DRBC προετοιμάστηκε και διαμοιράστηκε σε corning των 30 mL (18 mL corning⁻¹). Τα corning με το θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C έως τη χρήση τους. Τα Corning με το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, αρχικά στους 90 °C και μετά την ρευστοποίηση του θρεπτικού υλικού διατηρήθηκαν μέχρι τον εμβολιασμό σε θερμοκρασία 50 °C. Για κάθε στέλεχος μυκήτων προετοιμάστηκε αιώρημα σπορίων συγκέντρωσης 10^6 κονίδια mL^{-1} . Το θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκε με την μεταφορά 2 mL αιωρήματος σπορίων σε κάθε Corning, ανακινήθηκε ήπια και αποχύθηκε σε πλαστικό τρυβλίο διαμέτρου 10 cm. Μετά την στερεοποίηση

του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε διάνοιξη βοθρίων διαμέτρου 6 mm με τη βοήθεια κατάλληλου εργαλείου.

Τα τρυβλία σημάνθηκαν και σε κάθε βοθρίο (Εικόνα 29) τοποθετήθηκαν 60 μ L γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ή εκχυλίσματος MeOH στις συγκεντρώσεις που προαναφέρθηκαν. Για τα τρυβλία που μελετήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DMSO συγκέντρωσης 2%. Για τις βιοδοκιμές με MeOH εκχύλισμα ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε MeOH που δέχθηκε την ίδια ακριβώς μεταχείριση με το εξεταζόμενο εκχύλισμα. Για την διερεύνηση της επίδρασης του διαλύματος DMSO συγκέντρωσης 2% και του MeOH στους μύκητες ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 22 °C και επώαστηκαν για 6 μέρες. Η αντιμυκητική δράση εμφανίστηκε ως δακτύλιος αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης γύρω από τα βοθρία. Στο τέλος της επώασης καταγράφηκε σε κάθε περίπτωση η ελάχιστη συγκέντρωση του φυτοχημικού γύρω από την οποία ήταν ορατή μία ελάχιστη αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου. Η διάμετρος της ζώνη αναστολής γύρω από τα βοθρία εκφράστηκε σε mm. Για κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 29 (α,β): Σχηματική παράσταση βοθρίων (α) εφαρμογή αιθέριων ελαίων (β) εφαρμογή MeOH εκχυλίσματος του *S. horvatii*.

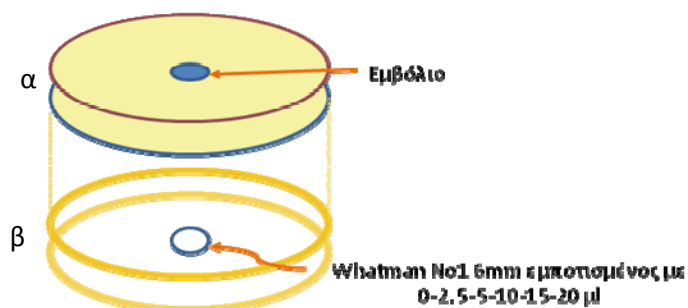
2.3.2.1.2 Μέθοδος εκτίμησης της επίδραση των πτητικών ενώσεων

Για την εκτίμηση της επίδρασης πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη του μυκηλίου αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα PDA διαμοιράστηκε λίγο πριν κρυώσει σε πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία των 10 cm (20 mL / τρυβλίο) και αφέθηκε να στερεοποιηθεί. Από την περιφέρεια καλλιέργειας 6 ημερών (*B. cinerea*, 4^{ων} ημερών) αποκόπηκε δίσκος μυκηλίου διαμέτρου 6 mm, μεταφέρθηκε,

τοποθετήθηκε στο κέντρο της επιφάνειας τρυβλίου που περιείχε 20 mL PDA και πιέστηκε ελαφρά ώστε να εξασφαλιστεί η επαφή του εμβολίου με το υπόστρωμα.

Στο κέντρο της εσωτερικής πλευρά του καλύματος του τρυβλίου (**Εικόνα 30**) τοποθετήθηκε ένας αποστειρωμένος δίσκος Whatman No 1 διαμέτρου 6mm, ο οποίος εμποτίστηκε με το αιθέριο έλαιο.

- 1^ο Πείραμα: 0-2.5-5-10-15-20 μL /τρυβλίο
- 2^ο Πείραμα: 0-2-3-4-5-6 μL /τρυβλίο (*F.oxysporum* : 7 μL /τρυβλίο)



Εικόνα 30: Σχηματική παράσταση τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές για την εκτίμηση της αντιμυκητικής δράσης των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου (α) κάλυμμα τρυβλίου (β) βάση τρυβλίου.

Τα τρυβλία κλείστηκαν με πλαστική μεμβράνη (parafilm) ώστε οι πτητικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου να παραμείνουν στον πειραματικό θάλαμο και επωάστηκαν στους 26 °C για 6 ημέρες. Για κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις. Για να εκτιμηθεί η ανάπτυξη του μύκητα λαμβάνονταν καθημερινά μετρήσεις της διαμέτρου των αποικιών (mm).

Η επίδραση των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου στην ανάπτυξη του μύκητα συγκριτικά με το μάρτυρα υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Ανάπτυξη (\%)} = 100 - \left[\frac{C-T}{C} * 100 \right]$$

Όπου:

C : Η διάμετρος της αποικίας του μάρτυρα (mm)

T: Η διάμετρος της αποικίας στη μεταχείρισης (mm)

Η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα σε $\mu\text{L L}^{-1}$ αέρα (MIC: Minimum inhibition concentration) υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη ότι ο όγκος του τρυβλίου είναι 77 mL και του θρεπτικού υλικού 20 mL.

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο τρόπος δράσης του αιθέριου ελαίου (μυκοστατική – μυκοτοξική) τα εμβόλια, τα οποία δεν αναπτύχθηκαν μεταφέρθηκαν σε καθαρά τρυβλία με υπόστρωμα PDA και επωάστηκαν στις ίδιες συνθήκες. Στην περίπτωση που μετά από μερικές μέρες παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μυκηλίου, η επίδραση χαρακτηρίστηκε ως μυκοστατική.

2.3.2.1.3 Μέθοδος ενσωμάτωσης σε στερεό μέσο

Για τη διερεύνηση της αντιμυκητικής δράσης του αιθέριου ελαίου με την μέθοδο της ενσωμάτωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ίδια με το προηγούμενο πείραμα ποσότητα αιθέριου ελαίου ανά τρυβλίο (0-2-3-4-5-6 mL/τρυβλίο) ενσωματωμένη στο θρεπτικό υλικό. Η συγκέντρωση δηλαδή του αιθέριου ελαίου στο θρεπτικό υλικό ήταν 0--133- 200- 267- 333- 400 ppm .

Σε corning των 50 mL τοποθετήθηκαν 44.5 mL PDA και διατηρήθηκαν σε υδατόλουτρο στη θερμοκρασία των 45 °C. Σε erendorf παρασκευάστηκε γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου με την προσθήκη 0-9-12-15-18 $\mu\text{L mL}^{-1}$ αιθέριο ελαίου σε 0.5 mL διάλυμα Tween 80 συγκέντρωσης 0.2 % (v/v). Το γαλάκτωμα προστέθηκε στο Corning και έπειτα από ανάδευση διαμοιράστηκε με αποστειρωμένη πιπέτα σε 3 τρυβλία (15 mL/τρυβλίο). Μετά τη στερεοποίηση του θρεπτικού υλικού τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με τα στελέχη των μυκήτων και επωάστηκαν στους 26 °C για 7 ημέρες. Για την αξιολόγηση της επίδρασης λήφθηκαν οι ίδιες μετρήσεις και πραγματοποιήθηκαν οι ίδιοι υπολογισμοί όπως αναφέρεται στην μέθοδο της διάχυσης σε στερεό μέσο (§ 2.5.1.1)

2.3.2.2 Στατιστική ανάλυση

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι πραγματικές τιμές της ζώνης αναστολής ή της μυκηλιακής ανάπτυξης (mm). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (One way ANOVA) με το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 20 και για τη σύγκριση των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Least Significant Difference (LSD) για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0.05$).

2.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων

2.4.1 Αέρια χρωματογραφία – φασματογραφία μάζας (GC-MS)

Προετοιμασία διαλύματος αιθέριου ελαίου για GC ανάλυση 1:400 σε εξάνιο

Αρχικά προετοιμάστηκε διάλυμα αιθέριου ελαίου 1% σε εξάνιο με την προσθήκη 25 μL σε 2.5 mL εξάνιο. Από αυτό το αρχικό διάλυμα 250 μL αναδιαλύθηκαν σε 750 μL εξάνιο.

Προετοιμασία μεθανολικού εκχυλίσματος για GC ανάλυση 10 % w/v

Το μεθανολικό εκχύλισμα (§ 2.2.5.1) χρησιμοποιήθηκε για χρωματογραφική ανάλυση αφού πρώτα πέρασε από μεμβράνη πολυαμιδίου 0,45 μm , διαμέτρου 25 mm.

Προετοιμασία διαλύματος εφαρμογής για GC ανάλυση 10 % w/v

2 mL από το φιλτραρισμένο μεθανολικό εκχύλισμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προετοιμάστηκε, όπως το διάλυμα, το οποίο εφαρμόστηκε στα κύτταρα (§2.3.1.2.2.2.1) με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε νερό αντί θεραπευτικού διαλύματος για την αναδιάλυση των αποξηραμένων συστατικών. Το υδατικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη, τοποθετήθηκε στους -20°C , λυοφιλοποιήθηκε, και αναδιαλύθηκε στην ίδια ποσότητα (2 mL) μεθανόλης.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου. Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (Master GC, Fast chromatograph, Dani) εφοδιασμένος με φασματογράφο μάζας (TOF MS, Dani), αυτόματο δειγματολήπτη (Master AS, Dani) και τριχοειδή στήλη χρωματογραφίας BP-5 της SGE (30m x 0.25mm x 0.25 μm). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με ροή 0.7 mL min⁻¹ και Split ratio 1:30. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς ήταν 250⁰C και 280⁰C αντίστοιχα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το εξής θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 60°-110° C με ρυθμό 3° C min⁻¹, 110° C ισόθερμα για 10 min, 110°-150° C με ρυθμό 3° C min⁻¹, 150°-280° C με ρυθμό 30° C min⁻¹, 280° C ισόθερμα για 5 min. Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας ήταν σε συνθήκη ηλεκτρονικού ιοντισμού, η θερμοκρασία της πηγής ήταν 200⁰C, η σάρωση έγινε για μάζες m/z από 50 έως 550 και η λήψη των δεδομένων με (acquisition rate) 5 φάσματα/s. Για τη λήψη και ηλεκτρονική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Master Lab Data Processing Sw. Version 01.20.20. Στον εισαγωγέα εισήχθη με τον αυτόματο δειγματολήπτη 1 μL διαλύματος.

Η ταυτοποίηση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης NIST MS search 2.0, την σύγκριση των δεικτών κατακράτησης (R.I) με τους δείκτες Kovats (Kovats Retention Index) για στήλη DB-5 και βιβλιογραφικά δεδομένα.

Οι δείκτες κατακράτησης (R.I) για όλα τα συστατικά προσδιορίστηκαν με τη χρήση διαλύματος αλκανίων (C₈ – C₂₀) ως πρότυπο το οποίο εισήχθη στον εισαγωγέα του χρωματογράφου κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες και τη σχέση:

$$RI = 100 \times n_o + [(RT_x - RT_{n_o}) / (RT_{n_1} - RT_{n_o})] \times 100$$

Όπου:

- **RI** = Δείκτης κατακράτησης
- **n_o** = τα άτομα άνθρακα του αλκανίου πριν το πτητικό συστατικό που επιδιώκεται να ταυτοποιηθεί.
- **RT_x** = ο χρόνος κατακράτησης του πτητικού συστατικού.
- **RT n_o** = ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου πριν το πτητικό συστατικό.
- **RT n₁** = ο χρόνος κατακράτησης του αλκανίου μετά το πτητικό συστατικό.

Για τον προσδιορισμό της ποιοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου έγινε η παραδοχή ότι στο χρωματογράφημα εμφανίζονται όλα τα συστατικά τα οποία περιέχονται στο αιθέριο έλαιο. Υπολογίστηκε το σύνολο των ταυτοποιημένων κορυφών επί του συνόλου των κορυφών. Η συνεισφορά κάθε ταυτοποιημένου συστατικού στο αιθέριο έλαιο υπολογίστηκε με την παραδοχή ότι το εμβαδόν όλων των ταυτοποιημένων κορυφών αντιπροσωπεύει το 100% των συστατικών του και τη σχέση:

$$C\% = (\text{Εμβαδό C} / \text{Συνολικό εμβαδό χρωματογραφήματος}) \times 100$$

Όπου:

C= ταυτοποιημένο συστατικό

2.4.2 Δυναμική υπερκείμενης φάσης - αέριος χρωματογραφία – φασματογραφία μάζας (DHS-GC-MS)

Η συλλογή και ανάλυση των πτητικών συστατικών του αρωματικού φυτού *S. horvatii ssp. macrophylla* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Dynamic Head space δειγματολήπτη (DHS) (Master DHS, Dani) συνδεδεμένο με το προαναφερόμενο σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας (GC-MS) (§ 2.4.1).

Το δείγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία 40 °C για 5 min, χωρίς ανάδευση. Η σύριγγα του Head space εισήχθη στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Τα πτητικά συστατικά μεταφέρθηκαν με ροή αερίου (He) 20 mL min⁻¹ για 4 min και προσροφήθηκαν στην “Κρύα” παγίδα θερμοκρασίας 35 °C. Με την άνοδο της θερμοκρασίας της παγίδας στους 250 °C, τα προσροφημένα συστατικά εκροφήθηκαν, η τυχόν υγρασία απομακρύνθηκε με κατάλληλη παγίδα (Dew stop) θερμοκρασίας 0 °C και τα συστατικά εισήχθησαν στον χρωματογράφο. Η διάρκεια της έγχυσης ήταν 1 min και η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς 250 °C. Ακολούθησε ο καθαρισμός του συστήματος για 10 min με ροή αερίου (He) 80 mL min⁻¹ θερμοκρασία παγίδας 280 °C και παγίδα υγρασίας 200 °C.

Στο φιαλίδιο του Head space τοποθετήθηκαν:

- 10 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού και 1 mL d H₂O
- 1 mL αποξηραμένο και αναδιαλυμένο σε d H₂O μεθανολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 10 mg mL⁻¹

Το φιαλίδιο κλείστηκε με αλουμινένιο πώμα το οποίο διέθεται ελαστικό διάφραγμα σιλικόνης και τοποθετήθηκε στον DHS αυτόματο δειγματολήπτη.

Για την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες της παραγράφου (§ 2.4.1).

Κεφάλαιο 3^ο

Αποτελέσματα

3.1 Φυτικό Υλικό

Για τις ανάγκες του πειραματισμού επιλέχθηκαν 11 φυτικά είδη από τα οποία 7 ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae και από ένα στις οικογένειες Cistaceae, Boraginaceae, Ranunculaceae, Rosaceae. Το πειραματικό υλικό συλλέχθηκε σε περιοχές της Ηπείρου, στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης. Στον **πίνακα 3** αναφέρονται τα φυτικά είδη που επιλέχθηκαν, καθώς επίσης στοιχεία για την περιοχή δειγματοληψίας και τη συλλογή του φυτικού υλικού.

Πίνακας 3 : Φυτικά είδη που συλλέχθηκαν						
α/α	Φυτικό είδος	Οικογένεια (Ημ/νία συλλογής)	Ελληνική ονομασία	Φυτικό όργανο-Στάδιο ανάπτυξης	Γεωγραφικό πλάτος, μήκος, υψόμετρο (m)	
1	<i>Cistus incanus</i>	Cistaceae (13-4-2009)	Κουνούκλα	Υπέργειο μέρος, στάδιο άνθισης	20° 00' 78'' 39° 26' 81'', 235m	
2	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae (13-4-2009)	Φαρμακευτικό Φασκόμηλο ή Αλισφακιά ή Ελελίσφακος	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της άνθισης (χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα)	20° 80' 84'' 39° 26' 48'', 187m	
3	<i>Salvia triloba</i>	Lamiaceae (25-5-2009)	Ελληνικό φασκόμηλο	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της άνθισης (χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα)	20° 28' 11'' 39° 38' 14'', 45m	
4	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	Lamiaceae (10-07-2009)	Ελληνική ρίγανη	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της άνθισης	20° 80' 84'' 39° 26' 48'', 187m	
5	<i>Corydanthus capitatus</i>	Lamiaceae (10-07-2009)	Ισπανική ρίγανη	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της άνθισης	20° 00' 78'' 39° 26' 81'', 235m	
6	<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae (10-07-2009)	Παναγιώχορτο	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της απάνθισης	20° 49' 22'' 39° 14' 12'', 131m	
8	<i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i>	Lamiaceae (20-08-2009)	Θρούμπι	Υπέργειο μέρος στην έναρξη της άνθισης	20° 48' 43'' 39° 17' 13'', 706 m	
9	<i>Helleborus cyclophyllus</i>	Ranunculaceae (31-09-2009)	Σκάρφη	Φύλλα με μίσχους	20° 55' 94'' 39° 22' 19'', 1059m	
10	<i>Heleborus cyclophyllus</i>	Ranunculaceae (08-11-2009)	Σκάρφη	Ρίζα	21° 02' 18'' 39° 48' 27''	
11	<i>Salvia triloba</i>	Lamiaceae	Φασκόμηλο	Αναβλάστηση	20° 56' 10'' 39° 22' 24'', 1069	
12	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae (16-03-2010)	Δεντρολίβανο	Μη ξηλοποιημένοι βλαστοί με φύλλα και άνθη	20° 56' 47'' 39° 07' 20'', 6m	
13	<i>Heleborus cyclophyllus</i>	Ranunculaceae (20-04-2010)	Σκάρφη	Ρίζα	20° 55' 94'' 39° 22' 19'', 1059m	
14	<i>Borago officinalis</i>	Boraginaceae	Μποράνγκο	Υπέργειο μέρος στο στάδιο της άνθισης	20° 48' 23'' 39° 16' 00'', 32m	
15	<i>Crataegus</i> sp.	Rosaceae	Κράταιγος, Μουρτζιά	Ανθισμένα κλαδιά	Γοργόμυλο	
16	<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	Μέλια	Τρυφεροί βλαστοί με φύλλα	20° 56' 39'' 39° 07' 19'', 7m	

Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνες 31-42**) διακρίνονται τα φυτικά είδη που επιλέχθηκαν και αποτέλεσαν μέρος του πειραματικού υλικού, εικόνες από τις περιοχές δειγματοληψίας, το φυτικό υλικό, καθώς επίσης λεπτομέρειες του άνθους ή της ταξιανθίας (στερεοσκόπιο Laica, φωτογραφική μηχανή Sony).



Εικόνα 31: *O. Vulgare* ssp. *hirtum* (Ελληνική ρίγανη), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) λεπτομέρεια ταξιανθίας και γ) άνθους



Εικόνα 32: *C. capitatus* (Ισπανικά ρίγανη ή θυμάρι), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, γ) λεπτομέρεια ταξιανθίας.



Εικόνα 33: *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (Θρούμπι), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (Παπαδάτες, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, γ) λεπτομέρεια Άνθους.



Εικόνα 34: *T. polium* (Παναγιώχορτο), α) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (ΡΙΖΟΒΟΥΝΙ, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), β) φυτικό υλικό, λεπτομέρεια ταξιανθίας.



Εικόνα 35: *S. officinalis* (Φαρμακευτικό φασκόμηλο), α, β) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή (ΡΙΖΟΒΟΥΝΙ, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), γ) ανθισμένοι βλαστοί.



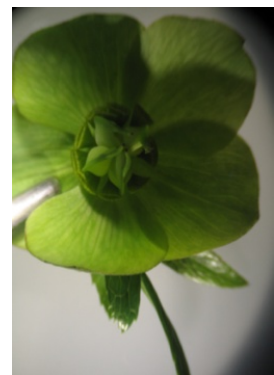
Εικόνα 36: *S. triloba* (Ελληνικό φασκόμηλο) συλλέχθηκε στην Πέρδικα, Δήμος Συβότων, Νομός Θεσπρωτίας) α, β) φυτό, γ) τρίλοβο φύλλο.



Εικόνα 37: *S. triloba* (Ελληνικό φασκόμηλο) αυτοφυής πληθυσμός, περιοχή Ανόι, Δήμος Ανωγιατών, Νομός Πρεβέζης, τρίλοβα φύλλα.



Εικόνα 38: *C. incanus* (Κουνούκλα ή Λάβδανο), περιοχή συλλογής (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), ανθισμένοι βλαστοί.



Εικόνα 39: *H. cyclophyllus* (Σκάρφη), περιοχή συλλογής (Ανόι, Δήμος Ανωγιατών, Νομός Πρεβέζης), λεπτομέρεια άνθους.



Εικόνα 40: *B. officinalis* (Μποράνγκο), περιοχή συλλογής (Ριζοβούνι, Δήμος Ζηρού, Νομός Πρεβέζης), λεπτομέρεια άνθους (στερεοσκόπιο Laica, φωτογραφική μηχανή Sony).



Εικόνα 42: *Crataegus oxycantha* (Μουρτζιά) στο στάδιο της άνθισης.



Εικόνα 41: *M. azedarach* (Μέλια) στο στάδιο της άνθισης.

3.2 Αποτελέσματα βιοδοκιμών

Στη συνέχεια αναφέρονται τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών που αφορούν τον έλεγχο της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των επιλεγμένων εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549 και φυσιολογικούς ινοβλάστες, καθώς και τα αποτελέσματα που αφορούν την αντιμυκητιακή δράση του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* σε 3 σημαντικής σπουδαιότητας φυτοπαθογόνων της Τομάτας.

3.2.1 Αποτελέσματα ελέγχου πιθανής αντικαρκινικής δράσης

3.2.1.1 Αποτελέσματα βιοχημικού ελέγχου

Στην συνέχεια αναφέρονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής και του προσδιορισμού πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot.

3.2.1.1.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής

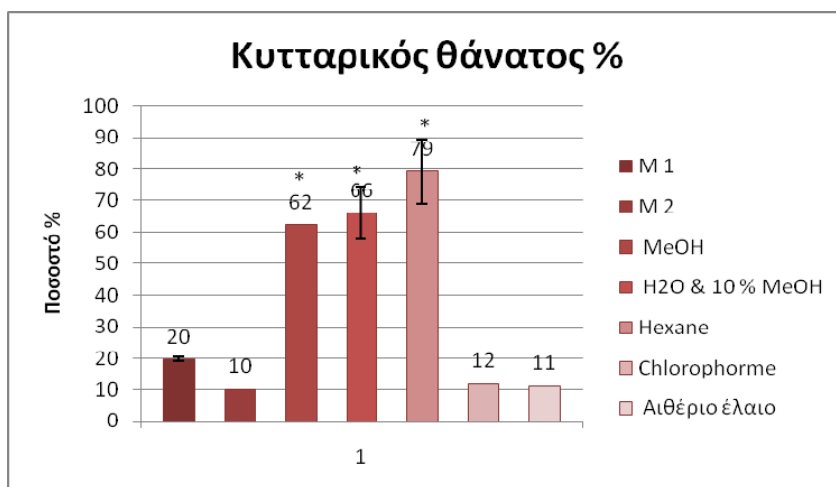
3.2.1.1.1.1 Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων

Τα πρώτα αποτελέσματα αφορούν την καταγραφή προβλημάτων κατά την προετοιμασία και εφαρμογή των διαλυμάτων εφαρμογής στην κυτταρική σειρά A549. Σε όλα τα προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό του *S. horvatii* ssp. *macrophylla*.

3.2.1.1.1.1.1 1ο προκαταρκτικό πείραμα: Προετοιμασία διαλυμάτων εφαρμογής

Κυτταρικός Θάνατος: Στο γράφημα που ακολουθεί (**Γράφημα 1**) αναφέρονται τα αποτελέσματα που αφορούν τον μέσο όρο % και την τυπική απόκλιση του κυτταρικού θανάτου των A549 κυττάρων 24 ώρες μετά την επίδραση μεθανολικού εκχυλίσματος, εκχυλίσματος εξανίου, d H₂O με 10%

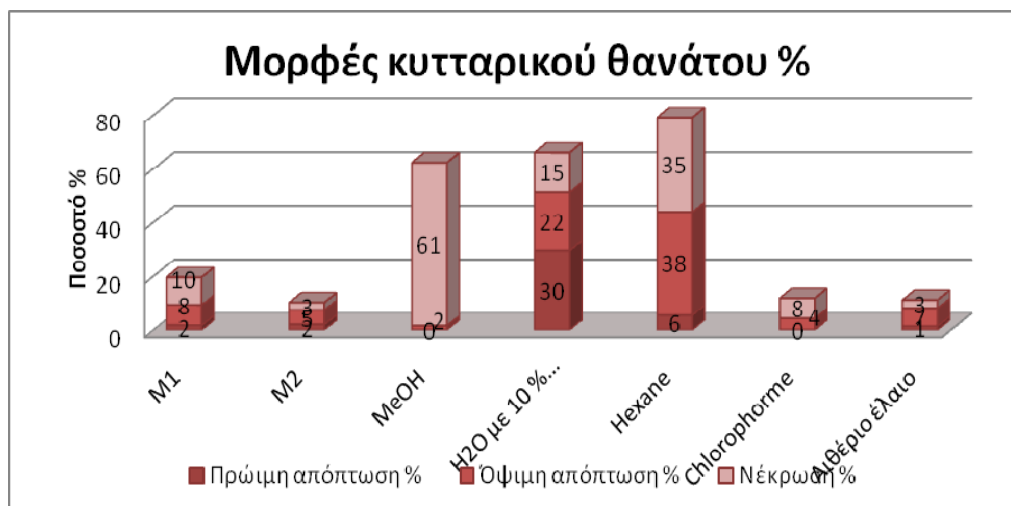
μεθανόλη, χλωροφορμικού εκχυλίσματος συγκέντρωσης 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού Ham's F12K και αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης 0.05 μL mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού Ham's F12K.



Γράφημα 1: Αποτελέσματα 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου. **M1:** Μη πλήρες Ham's F12K, **M2:** DMSO 0.45 μL mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K, **MeOH:** Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL⁻¹), **H₂O & 10% MeOH:** εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL⁻¹), **Hexane:** Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL⁻¹), **Chlorophorme:** Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL⁻¹), **Αιθέριο έλαιο:** 0.05 μL mL⁻¹. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα M1.

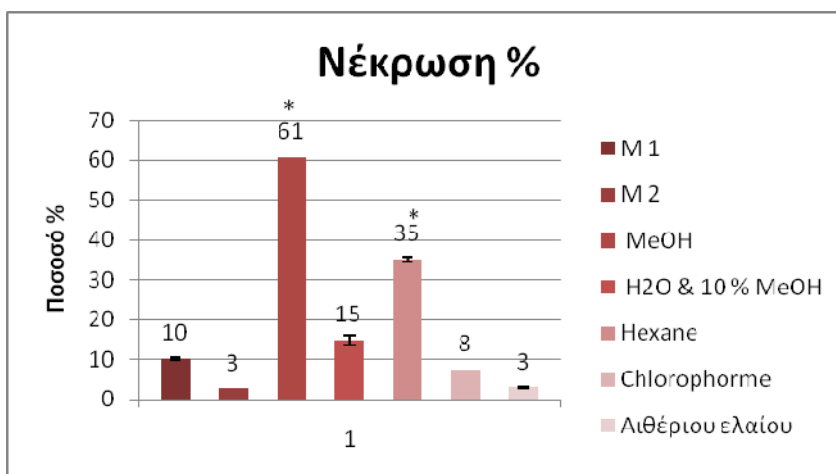
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, για επίπεδο σημαντικότητας 5 %, αναφορικά με την ικανότητα των επιλεγμένων εκχυλισμάτων να προκαλούν κυτταρικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα A549, 24 ώρες μετά την εφαρμογή τους σε αυτά (one way anova p=0.000). Σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου παρατηρήθηκε έπειτα από επίδραση με τα εκχυλίσματα εξανίου (Dunnett t-tests p=0,02), μεθανόλης (Dunnett t-tests p=0.014) και d H₂O με 10% μεθανόλης (Dunnett t-tests p=0,09), ενώ το χλωροφορμικό εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο δεν παρουσίασαν σημαντική επίδραση συγκριτικά με τον μάρτυρα (Duncan p=0,38). Το DMSO σε συγκέντρωση 0.45 μL mL⁻¹ δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη των κυττάρων και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη συγκέντρωση για την προετοιμασία του διαλύματος των αιθέριων ελαίων.

Ανάλυση κυτταρικού θανάτου: Στο επόμενο γράφημα (**Γράφημα 2**) αναλύεται ο κυτταρικός θάνατος στα φαινόμενα που τον προκαλούν. Το μεθανολικό εκχύλισμα φαίνεται ότι προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο των A549 κυττάρων μέσω του μηχανισμού της νέκρωσης ενώ τα εκχυλίσματα εξανίου και d H₂O με 10% Μεθανόλη επάγουν το μηχανισμό της απόπτωσης (πρώιμη και όψιμη) σε σημαντικό ποσοστό.



Γράφημα 2: Αποτελέσματα 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος: Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν. **M1:** Μη πλήρες Ham's F12K, **M2:** DMSO 0,45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, **MeOH:** **Μεθανολικό εκχύλισμα** (20 mg mL^{-1}), **H₂O & 10% MeOH:** εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), **Hexane:** Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), **Chlorophorme:** Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), **Αιθέριο έλαιο:** 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K.

Νέκρωση %: Στο επόμενο γράφημα (**Γράφημα 3**) αναφέρεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της νέκρωσης των A549 κυττάρων, έπειτα από την επίδραση των εκχυλισμάτων.

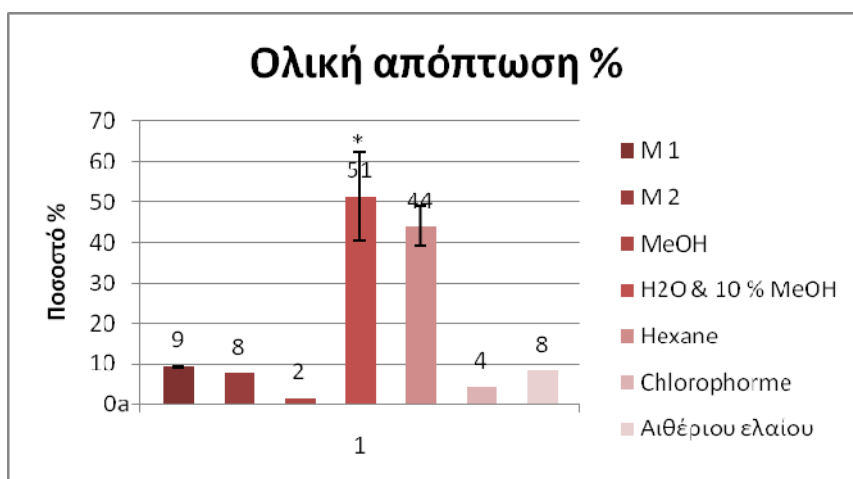


Γράφημα 3: Αποτελέσματα 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση νέκρωσης. **M1:** Μη πλήρες Ham's F12K, **M2:** DMSO 0.45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, **MeOH:** Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), **H₂O & 10% MeOH:** εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), **Hexane:** Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), **Chlorophorme:** Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), **Αιθέριο έλαιο:** 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K.

Μεγαλύτερο ποσοστό επίδρασης ως προς την νέκρωση των A549 κυττάρων σημειώθηκε έπειτα από επίδραση με MeOH εκχύλισμα (one way anova $p=0.00$, Dunnett t-tests $p=0.00$) και ακολουθεί το

διάλυμα εξανίου (Duncan $p=0.011$), ενώ τα υπόλοιπα διαλύματα δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική επίδραση ως προς τη νέκρωση των κυττάρων συγκριτικά με το μάρτυρα.

Ολική απόπτωση: Το γράφημα που ακολουθεί (**Γράφημα 4**) αναφέρεται στο μέσο όρο (%) και την τυπική απόκλιση της ολικής απόπτωσης των A549 κυττάρων λόγω της επίδρασης των εκχυλισμάτων.

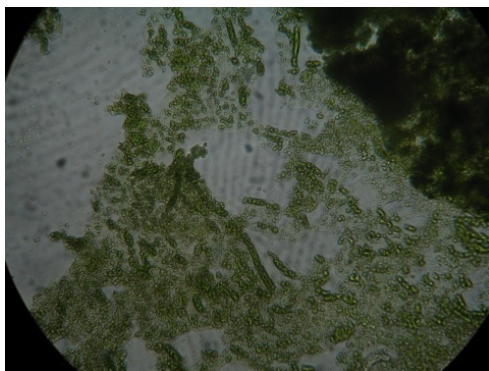


Γράφημα 4: Αποτελέσματα 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ολικής απόπτωσης. **M1:** Μη πλήρες Ham's F12K, **M2:** DMSO 0.45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K, **MeOH:** Μεθανολικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), **H₂O & 10% MeOH:** εκχύλισμα νερού περιεκτικότητας 10% σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}), **Hexane:** Εκχύλισμα εξανίου (20 mg mL^{-1}), **Chlorophorme:** Χλωροφορμικό εκχύλισμα (20 mg mL^{-1}), **Αιθέριο έλαιο:** 0.05 $\mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K.

Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη επίδραση ως προς την ολική απόπτωση των A549 κυττάρων παρατηρήθηκε έπειτα από επέμβαση με το εκχύλισμα d H₂O με 10% μεθανόλη (Anova $p=0.025$, Dunnett t-tests $p=0,05$). Στις μεταχειρίσεις με d H₂O και 10% μεθανόλη και του εκχυλίσματος εξανίου διαπιστώθηκε μεγάλη τυπική απόκλιση των μέσων όρων.

Κατά τη διάρκεια του 1^{ου} προκαταρκτικού πειράματος παρατηρήθηκαν τα εξής:

- **Μεθανολικό εκχύλισμα:** Μετά την προσθήκη θρεπτικού υλικού στο αποξηραμένο MeOH εκχύλισμα παρατηρήθηκε, ότι στο διάλυμα αιωρούνται μικρά μαύρα στερεά τεμαχίδια. Η φύση αυτών των τεμαχιδίων διερευνήθηκε μικροσκοπικά και διαπιστώθηκε (**Εικόνα 43**), ότι πρόκειται για τεμαχίδια φυτικού ιστού. Πριν την εφαρμογή του εκχυλίσματος στα κύτταρα θεωρήθηκε απαραίτητη η απομάκρυνσή των φυτικής προέλευσης στερεών συστατικών με τη διαδικασία της φυγοκέντρησης.



Εικόνα 43: Μικροσκοπική παρατήρηση ιζήματος αποξηραμένου και αναδιαλυμένου σε υδατικό μέσο μεθανολικού εκχυλίσματος. Διακρίνονται παρεγχυματικά κύτταρα.

- **Εκχύλισμα εξανίου:** Έπειτα από επίδραση με εκχύλισμα εξανίου διαπιστώθηκε ο κυτταρικός θάνατος οφείλεται τόσο σε νέκρωση όσο και σε απόπτωση. Η μεγάλη τυπική απόκλιση που παρατηρήθηκε δείχνει, ότι υπάρχει κακή επαναληψιμότητα. Κατά την προσπάθεια αναδιάλυσης των συστατικών του ξηρού εκχυλίσματος εξανίου στο θρεπτικό υλικό παρατηρήθηκε ότι κάποια συστατικά παραμένουν αδιάλυτα στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.
- **Εκχύλισμα d H₂O & 10% μεθανόλη:** Τα συστατικά που παραλήφθηκαν φαίνεται, ότι προκαλούν **απόπτωση**. Σε αυτή την περίπτωση διαπιστώθηκε κακή επαναληψιμότητα στις μετρήσεις, δίχως να παρατηρηθεί δυσκολία στην αναδιάλυση των συστατικών του ξηρού εκχυλίσματος στο θρεπτικό υλικό, όπως στην περίπτωση του εξανίου.
- **Χλωροφορμικό εκχύλισμα:** Δεν παρουσίασε κάποια επίδραση στα A549 κύτταρα. Πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι μετά την προσθήκη θρεπτικού υλικού στο ξηρό χλωροφορμικό εκχύλισμα παρέμειναν αδιάλυτα συστατικά στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα.
- **Αιθέριο έλαιο:** σε συγκέντρωση 0.05 μl/ml δεν έδειξε κάποια σημαντική επίδραση.

3.2.1.1.1.2 Αποτελέσματα δοκιμών διαλυτότητας

Λόγω της κακής αναδιάλυσης των αποξηραμένων εκχυλισμάτων εξανίου και χλωροφορμίου στο θρεπτικό υλικό ελέγχθηκε η διαλυτότητά τους σε MeOH και DMSO. Η παρουσία MeOH και DMSO σε συγκέντρωση 5% είναι ανεκτή από τα κύτταρα.

Διαπιστώθηκε πολύ κακή διαλυτότητα του εκχυλίσματος d H₂O & 10% MeOH και του εκχυλίσματος εξανίου σε MeOH. Για την αναδιάλυση του αποξηραμένου εκχυλίσματος d H₂O & 10% MeOH και εξανίου σε DMSO χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι. Το DMSO ήταν καταλληλότερος διαλύτης

για όλα τα εκχυλίσματα. Το αποξηραμένο και αναδιαλυμένο σε DMSO εκχύλισμα εξανίου παρουσίασε κολλώδη υφή.

3.2.1.1.1.3 Αποτελέσματα 2ου Προκαταρκτικού πειράματος: Εναλλακτικός τρόπος εφαρμογής των εκχυλισμάτων

Με τα αποτελέσματα αυτού του πειραματισμού διαπιστώθηκαν τα εξής:

- **Χλωροφορμικό εκχύλισμα:** Σε αυτόν τον τρόπο εφαρμογής δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στα κύτταρα.
- **Εκχύλισμα εξανίου:** Σε αντίθεση με το πρώτο πείραμα που έδειξε υψηλό ποσοστό κυτταρικού θανάτου δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση συγκριτικά με τον μάρτυρα. Σημειώνεται ότι το εκχύλισμα εξανίου σε DMSO συγκέντρωσης 4.000 mg έχει κολλώδη υφή όπως επίσης και το ίζημα των κυττάρων, κάτι που πιθανό να δημιουργεί πρόβλημα στην διάλυση του διαλύματος εφαρμογής στο θρεπτικό υλικό, την επαναιώρηση των κυττάρων στο διάλυμα του Binding buffer σε PBS και ενδεχομένως στην αντίδρασή τους με τα Anexin-V και PI.
- **Μεθανολικό εκχύλισμα:** Με αυτόν τον τρόπο εφαρμογής φαίνεται, ότι τα συστατικά που παραλαμβάνονται και περιέχονται στο MeOH εκχύλισμα επηρεάζουν την επιβίωση των A549 κυττάρων.

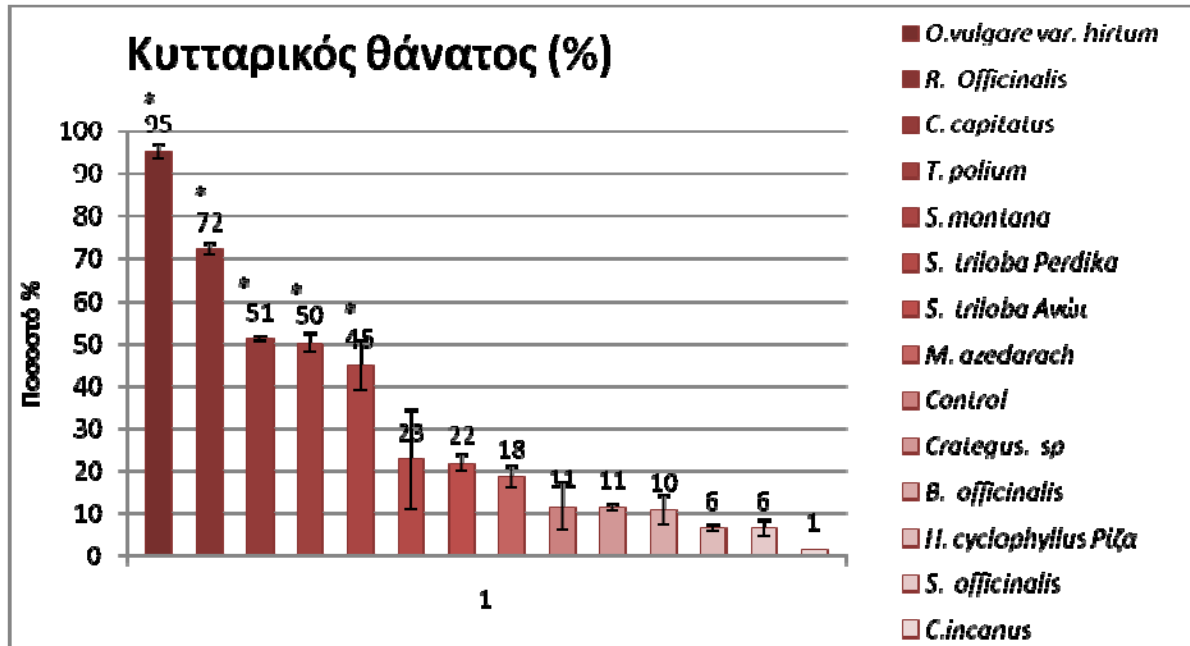
Με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν για τη συνέχεια των πειραμάτων τα μεθανολικά εκχυλίσματα των επιλεγμένων φυτικών ειδών και τα διαλύματα εφαρμογής να προετοιμαστούν όπως στο 1^ο προκαταρκτικό πείραμα (§ 2.3.3.1.1).

3.2.1.1.1.2 Αποτελέσματα κυρίως πειραμάτων

3.2.1.1.1.2.1 Πείραμα 1^ο: Πρώτη διερεύνηση της επίδρασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων (screening)

Στα παρακάτω γράφημα (**Γραφήματα 5-6**) αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των μεθανολικών εκχυλισμάτων των επιλεγμένων φυτικών ειδών συγκέντρωσης 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K 24 ώρες μετά την εφαρμογή τους σε καρκινικά κύτταρα A549. Για τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος φύλλων του *H. cyclophyllus* δεν λήφθηκαν αποτελέσματα κατά τη μέτρηση με κυτταρομετρία ροής. Συνεπώς τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη μεταχείριση δεν περιλαμβάνονται στα παρακάτω γραφήματα.

Το επόμενο γράφημα (**Γράφημα 5**) αφορά το μέσο όρο % και την τυπική απόκλιση της επίδρασης που σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο των A549 κυττάρων.



Γράφημα 5: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου 24 ώρες μετά την επίδραση των αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων (20 mg mL^{-1}) των επιλεγμένων φυτικών ειδών. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα (control).

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά για επίπεδο σημαντικότητας 5% αναφορικά με την συνολική επίδραση των εκχυλισμάτων που εφαρμόστηκαν (One way ANOVA $p=0.00$). Το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου σημειώθηκε έπειτα από επίδραση με εκχύλισμα του *O. vulgare* spp. *hirtum* και ακολουθούν το *R. officinalis*, τα *C. capitatus* και *T. polium* και *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (Dunnett t-tests $p=0.00$). Τα υπόλοιπα είδη δεν παρουσίασαν σημαντική επίδραση.

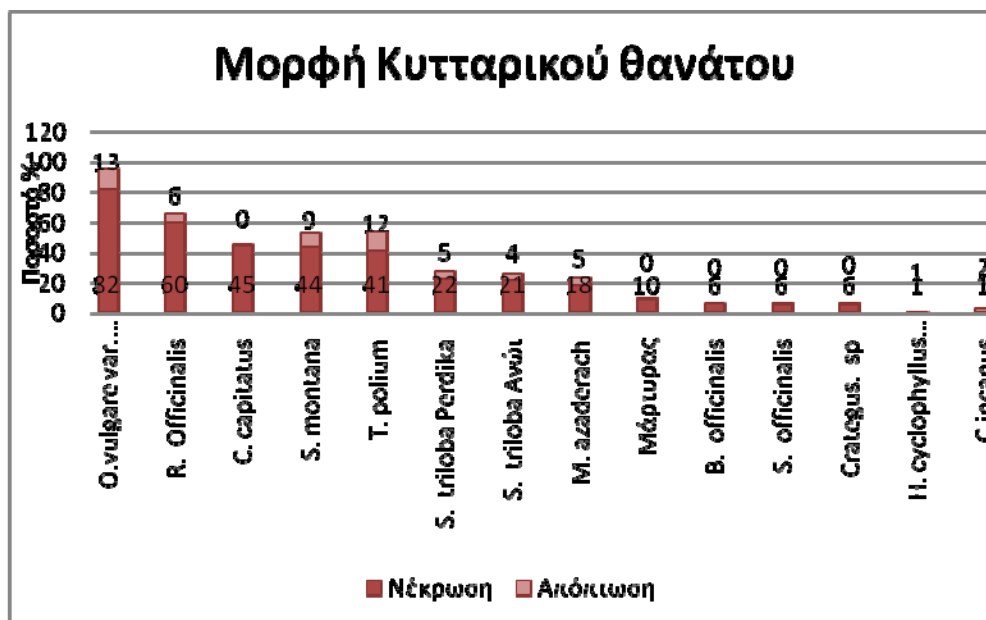
Ανάλυση κυτταρικού θανάτου: Οι μορφές του κυτταρικού θανάτου αναλύονται παρακάτω (Γράφημα 6). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων τα μεθανολικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 20 mg mL^{-1} μη πλήρους Ham's F12K των επιλεγμένων φυτικών ειδών προκαλούν κυρίως νέκρωση στα A549 κύτταρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειραματισμού ενδιαφέρον για περεταίρω διερεύνηση παρουσίασαν τα αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae:

- *O. vulgare* spp. *hirtum*- Ελληνική ρίγανη
- *R. officinalis*-Δεντρολίβανο
- *C. capitatus*- Ισπανική ρίγανη ή Θυμαρί

- *T. Polium*- Παναγιώχορτο
- *S. horvatii* ssp. *macrophylla* - Θρούμπι

Το είδος *H. cycllophyllus* της οικογένειας Ranunculaceae παρουσίασε επίσης ενδιαφέρον. Το γεγονός ότι δεν λήφθηκαν αποτελέσματα κατά τη μέτρηση αυτών των δειγμάτων σημαίνει ότι δεν υπήρχαν 10.000 κύτταρα κάτι που δείχνει ότι το εκχύλισμα είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό.

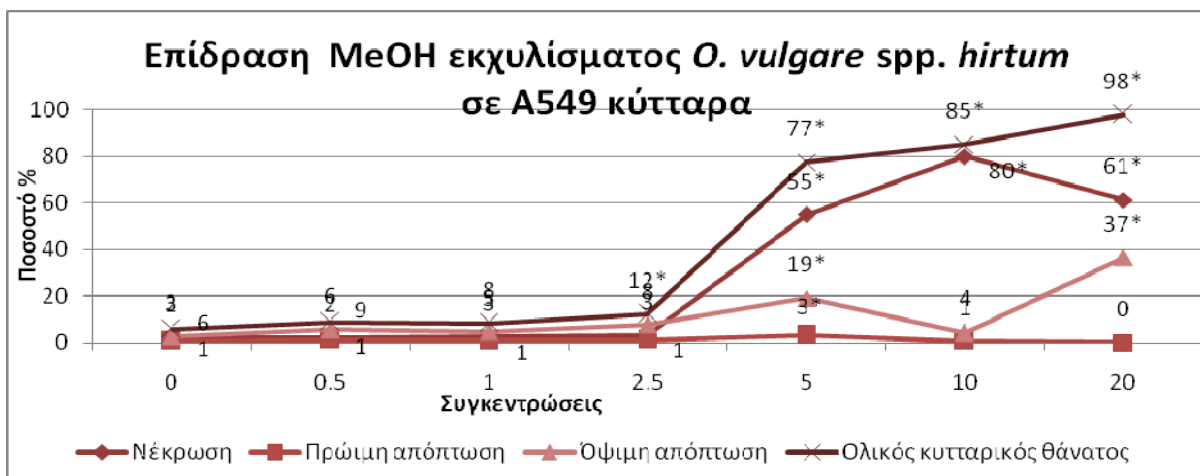


Γράφημα 6: Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν 24 ώρες μετά την επίδραση των αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλίσματων (20 mg mL^{-1}) των επιλεγμένων φυτικών ειδών.

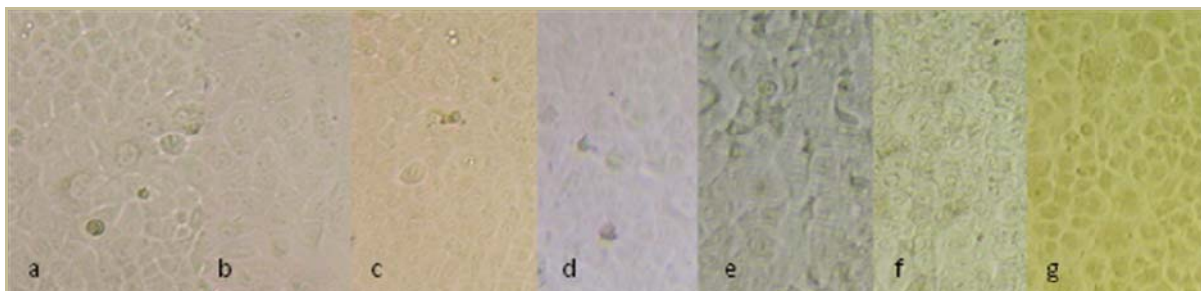
3.2.1.1.2.2 Πείραμα 2ο: Δοσοεξαρτώμενα πειράματα μεθανολικών εκχυλίσμάτων σε A549 κύτταρα

3.2.1.1.2.2.1 *O. vulgare* spp. *hirtum* (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL^{-1})

Τα αποτελέσματα της επίδρασης αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλίσμάτων του *O. vulgare* spp. *hirtum* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL^{-1} σε A549 κύτταρα, μετά από 24 ώρες αναφέρονται στο παρακάτω γράφημα (**Γράφημα 7**). Σε πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακα 4**) αναφέρονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση επίδρασης (%). Οι μορφολογικές αλλοιώσεις που διαπιστώθηκαν έπειτα από παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φωτογραφήθηκαν και παρουσιάζονται στην **Εικόνα 44**.



Γράφημα 7: Το *O. vulgare* spp. *hirtum* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC/PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλίσμάτων συγκέντρωσης 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης, του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα (P≤0.05) συνοδεύονται από αστεράκι.



Εικόνα 44: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσμάτων του *O. vulgare* spp. *hirtum* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 0.5 mg mL⁻¹, (c) 1 mg mL⁻¹, (d) 2.5 mg mL⁻¹, (e) 5 mg mL⁻¹, (f) 10 mg mL⁻¹, (g) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K.

Πίνακας 4: Μέσος όρος % και τυπική απόκλιση της επίδρασης του *O. vulgare* spp *hirtum* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε A549 κύτταρα μετά από 24 ώρες

Συγκ/σεις	Νέκρωση	Πρόωρη απόπτωση	Απόπτωση	Κυτταρικός θάνατος
M	2.24 ±1.9	0.71 ±0	2.84 ±0.4	5.785 ±1.5
0.5	2.11 ±0.2	1.24 ±0.2	5.59 ±0.3	8.935 ± 0.4
1	2.52 ±1	0.93 ±0.1	4.86±0	8.305 ±0.9
2.5	3.36 ±0.2	1.20 ±0.2	7.81±1.1	12.36±1.2
5	54.90 ±4.8	3.30± 1.1	19.26 ±6.9	77.45±3.1
10	80.09 ± 0.6	0.66 ±0.3	4.41±2.9	85.155 ±2.7
20	61.29 ±7.5	0.02 ±0	36.62 ±7.9	97.92 ± 0.3

Συγκέντρωση 0.5 & 1 mg mL⁻¹: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση συγκριτικά με το Μάρτυρα .

Συγκέντρωση 2.5 mg mL⁻¹: Επηρεάζει την επιβίωση των A549 κυττάρων. Ο κυτταρικός θάνατος (12.36 ±1.2 %) παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα (Dunnett p=0.03).

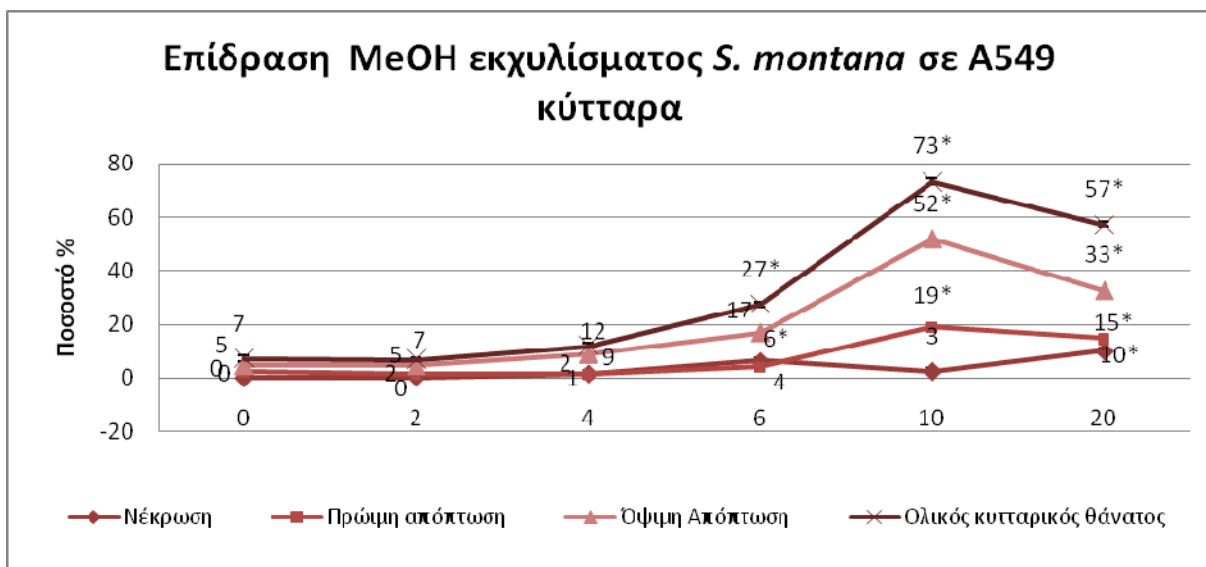
Συγκέντρωση 5 mg mL⁻¹: Ο κυτταρικός θάνατος (77.45 ±3.1 %) παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα (Dunnett p=0.000). Μεγάλο ποσοστό φαίνεται ότι οφείλεται σε νέκρωση (54.90 ±4.8 %) (Dunnett p=0.000), όμως σημαντικά είναι και τα ποσοστά της όψιμης (19.26 ±6.9) (Dunnett p=0.0222), καθώς και της πρώιμης απόπτωσης (3.30± 1.1) (p=0.0028). Στη συγκέντρωση αυτή, 24 ώρες μετά την επίδραση, τα κύτταρα παρουσιάζουν μορφολογικές αλλοιώσεις. Είναι διογκωμένα και το ίζημα των κυττάρων παρουσιάζει κολλώδη υφή.

Συγκέντρωση 10 mg mL⁻¹: Παρατηρείται στατιστικώς σημαντικό ποσοστό κυτταρικού θανάτου (85.16 ±2.7%) (Dunnett p=0.000), ο οποίος οφείλεται σε νέκρωση των κυττάρων (80.09 ± 0.6) (Dunnett p=0.000). Δεν καταγράφηκαν σημαντικά ποσοστά πρώιμης και όψιμης απόπτωσης. Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση του ταπήτιου των κυττάρων διαπιστώθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις στα κύτταρα και το ίζημα των κυττάρων είχε κολλώδη υφή. Σημειώνεται μάλιστα ότι κατά την διαδικασία της σήμανσης των κυττάρων με Annexin V-FITC, PI και την προετοιμασία τους για κυτταρομετρία ροής μία μικρή κολλώδης μάζα κυττάρων είχε κολλήσει στο tip (δεν ήταν δυνατό να αποκολληθεί με την εκροή).

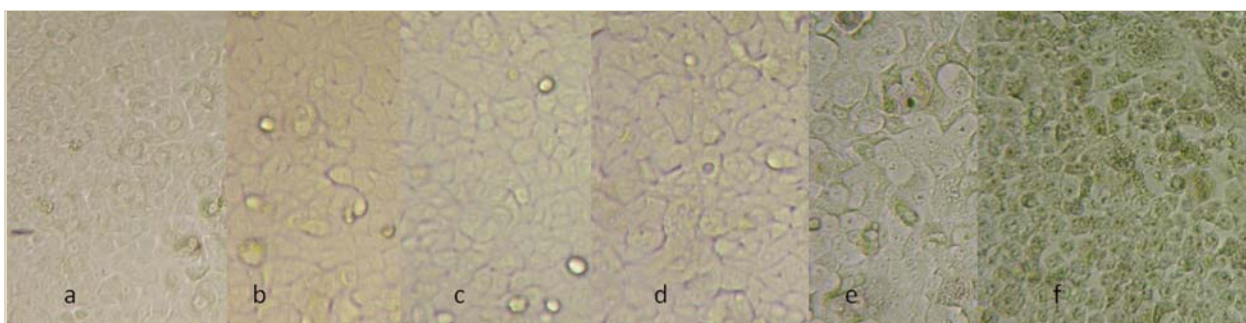
Συγκέντρωση 20 mg mL⁻¹: Παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (97.92 ± 0.3 %) (Dunnett p=0.000), το οποίο οφείλεται κυρίως σε νέκρωση (61.29 ±7.5 5) (Dunnett p=0.000) και σημαντικό ποσοστό όψιμης απόπτωσης (36.62 ±7.9)(Dunnett p=0.0004)

3.2.1.1.2.2.2 *S. horvatii ssp. macrophylla* (0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹)

Στο γράφημα που ακολουθεί (**Γράφημα 8**) αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης μεθανολικών εκχυλισμάτων του φυτικού είδους *S. montana* σε A549 κύτταρα. Εφαρμόστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. Οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση του κυτταρικού θανάτου και των μορφών στις οποίες αυτός αναλύεται αναφέρονται στον **πίνακα 5**. Στην **εικόνα 45** παρουσιάζονται οι μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων 24 ώρες μετά την επίδραση των διαλυμάτων.



Γράφημα 8: Το *S. horvatii* ssp. *macrophylla* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλίσμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα ($P \leq 0.05$) συνοδεύονται από αστεράκι.



Εικόνα 45: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσμάτων του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπίτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K.

Πίνακας 5: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση % της επίδρασης του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ σε A549 κύτταρα μετά από 24 ώρες

Συγκ/σεις mg/ml	Νέκρωση	Πρώιμη απόπτωση	Όψιμη Απόπτωση	Ολικός κυτταρικός θάνατος
0	0.14 ± 0.05	2.25 ± 0.16	4.795 ± 1.42	7.175 ± 1.63
2	0.24 ± 0.18	1.55 ± 0.01	4.895 ± 0.56	6.68 ± 0.75
4	1.64 ± 0.49	1.39 ± 0.18	8.94 ± 1.29	11.965 ± 1.61
6	6.25 ± 0.87	4.2 ± 0.31	17.025 ± 2.84	27.47 ± 1.65
10	2.55 ± 1.17	18.95 ± 1.28	51.88 ± 5.9	73.375 ± 6
20	10.03 ± 2.16	14.60 ± 0.11	32.695 ± 13.31	57.32 ± 11.26

Συγκέντρωση 2 & 4 mg mL⁻¹: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση συγκριτικά με το μάρτυρα.

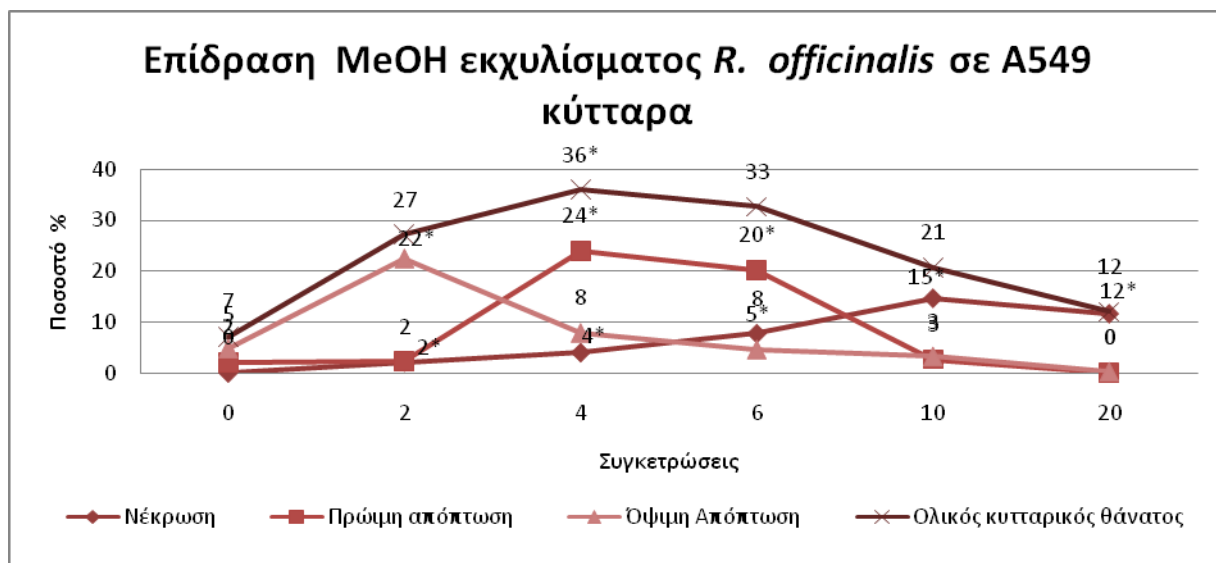
Συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά αναφορικά με τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων που δέχθηκαν τη συγκεκριμένη μεταχείριση (27.47 ± 1.65 %) (Dunnett $p=0.0312$) και του μάρτυρα, όπως επίσης και σημαντικό ποσοστό πρώιμης απόπτωσης ($4.2 \pm 0.31\%$) (Dunnett $p=0.0049$) και όψιμης απόπτωσης (Dunnett $p=0.040$).

Συγκέντρωση 10 mg mL⁻¹: Παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου ($73.375 \pm 6\%$) (Dunnett $p=0.000$), το οποίο οφείλεται σε ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης. Το ποσοστό της πρώιμης απόπτωσης ανέρχεται σε ποσοστό 18.95 ± 1.285 (Dunnett $p=0.000$) και της όψιμης απόπτωσης σε ποσοστό $51.88 \pm 5.9\%$ (Dunnett $p=0.000$), ενώ το ποσοστό της νέκρωσης (2.55 ± 1.175) ήταν στατιστικώς μη σημαντικό (Dunnett $p=0.209$) συγκριτικά με το μάρτυρα. Στη συγκέντρωση αυτή, 24 ώρες μετά την επίδραση, τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλοιώσεις. Ήταν διογκωμένα και το ίζημα των κυττάρων είχε κολλώδη υφή.

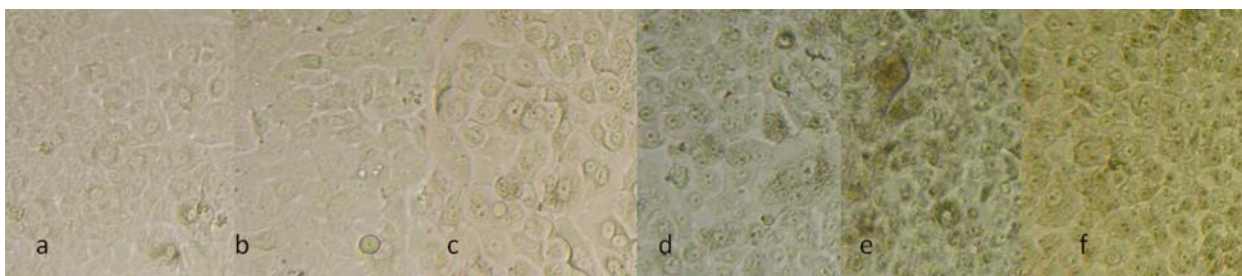
Συγκέντρωση 20 mg mL⁻¹: Το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου, αν και μειώθηκε παρέμεινε στατιστικώς σημαντικό συγκριτικά με το μάρτυρα (57.32 ± 11.26 %) (Dunnett $p=0.000$). Σημαντικά ήταν τα ποσοστά της όψιμης απόπτωσης ($32.695 \pm 13.31\%$) (Dunnett $p=0.000$), πρώιμης απόπτωσης (14.60 ± 0.115) (Dunnett $p=0.014$) και νέκρωσης ($10.03 \pm 2.16\%$) (Dunnett $p=0.000$) των κυττάρων. Τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλοιώσεις, ήταν λιγότερο διογκωμένα συγκριτικά με τη συγκέντρωση 10 mg/mL και το ίζημα των κυττάρων δεν είχε κολλώδη υφή. Τα κύτταρα **δεν είχαν συνοχή** (σαν άμμος) και υπήρχε κίνδυνος απομάκρυνσης κυττάρων με την αφαίρεση του PBS.

3.2.1.1.2.2.3 *R. officinalis*

Τα αποτελέσματα της επίδρασης αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων του *R. officinalis* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε A549 κύτταρα, μετά από 24 ώρες αναφέρονται στο παρακάτω γράφημα (**Γράφημα 9**). Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακα 6**) αναφέρεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση επίδρασης (%). Οι μορφολογικές αλλοιώσεις που διαπιστώθηκαν έπειτα από παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φωτογραφήθηκαν και παρουσιάζονται στην **Εικόνα 46**.



Γράφημα 9: Το *R. officinalis* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα ($P \leq 0.05$) συνοδεύονται από αστεράκι.



Εικόνα 46: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *R. officinalis* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K.

Πίνακας 6: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση % της επίδρασης του <i>R. officinalis</i> συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 5, 10, 20 mg/mL σε A549 κύτταρα μετά από 24 ώρες				
mg mL ⁻¹	Νέκρωση	Πρώιμη απόπτωση	Όψιμη Απόπτωση	Ολικός κυτταρικός θάνατος
0	0.14 ± 0.0	2.25 ± 0.2	4.80 ± 1.4	7.18 ± 1.6
2	2.27 ± 0.2	2.45 ± 0.3	22.46 ± 1.2	27.18 ± 1.7
4	4.115 ± 1.4	23.98 ± 5.7	7.87 ± 6.4	35.97 ± 13.5
6	7.805 ± 0.1	20.17 ± 8.1	4.62 ± 3.4	32.59 ± 11.4
10	14.72 ± 0.2	2.80 ± 3.3	3.26 ± 3.9	20.77 ± 7.3
20	11.695 ± 0.3	0.17 ± 0.2	0.25 ± 0.2	12.11 ± 0.1

Συγκέντρωση 2 mg mL⁻¹: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικό ποσοστό όψιμης απόπτωσης ($22.46 \pm 1.2 \%$) (Dunnett $p=0.008$) και νέκρωσης ($2.27 \pm 0.2\%$) (Dunnett $p=0.0392$) συγκριτικά με το μάρτυρα. Παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με κάποια διόγκωση των κυττάρων.

Συγκέντρωση 4 mg mL⁻¹: Ο κυτταρικός θάνατος ($35.97 \pm 13.5\%$) (Dunnett $p=0.0366$), ο οποίος οφείλεται κυρίως σε πρώιμη απόπτωση ($23.98 \pm 5.7\%$) (Dunnett $p=0.0079$) και νέκρωση ($4.115 \pm 1.4\%$) (Dunnett $p=0.002$) παρουσίασε στατιστικώς σημαντική επίδραση συγκριτικά με το μάρτυρα. Στο ανάστροφο μικροσκόπιο παρατηρήθηκε διόγκωση των κυττάρων και το ίζημα των κυττάρων παρουσίασε κολλώδη υφή.

Συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικό ποσοστό πρώιμης απόπτωσης ($20.17 \pm 8.1\%$) (Dunnett $p=0.0197$) και νέκρωσης ($7.805 \pm 0.1\%$) (Dunnett $p=0.0001$) συγκριτικά με το μάρτυρα. Παρατηρήθηκε διόγκωση των κυττάρων και το ίζημα των κυττάρων είχε κολλώδη υφή.

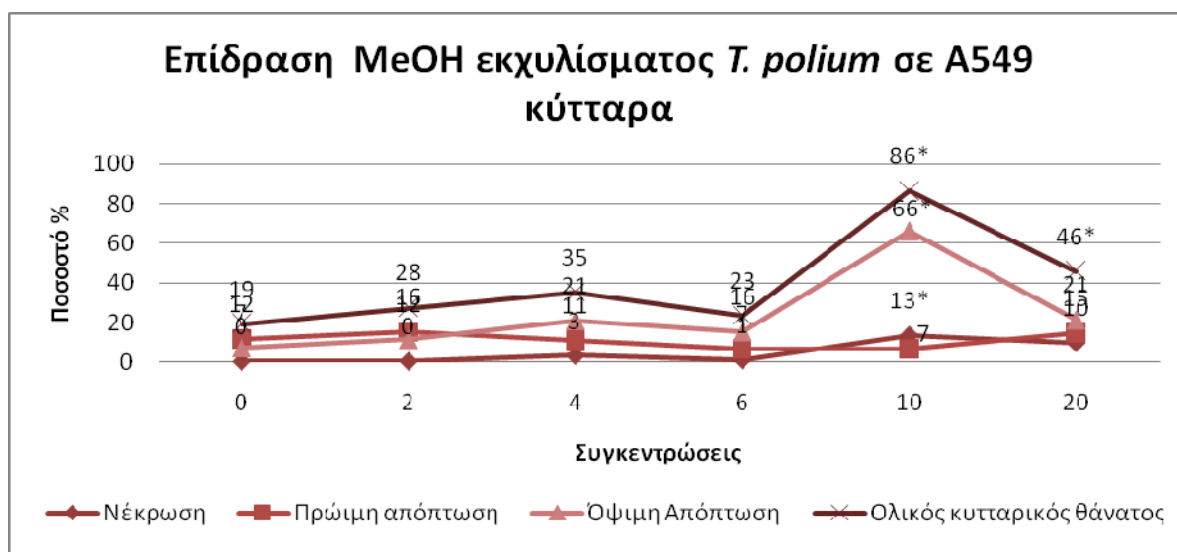
Συγκέντρωση 10 mg mL⁻¹: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα αναφορικά με τον κυτταρικό θάνατο, το ποσοστό της πρώιμης και όψιμης απόπτωσης και της νέκρωσης των A549 κυττάρων. Τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλοιώσεις όμως **δεν είχαν συνοχή** (σαν άμμος) και υπήρχε κίνδυνος απομάκρυνσης των κυττάρων με την αφαίρεση του PBS.

Συγκέντρωση 20 mg mL⁻¹: Παρόλο που το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου ($12.11 \pm 0.1\%$) και της απόπτωσης πρώιμης ($0.17 \pm 0.2\%$) και όψιμης ($0.25 \pm 0.2\%$) δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα παρατηρήθηκε όμως σημαντική διαφορά ως προς τη νέκρωση ($11.695 \pm 0.3\%$) (Dunnett $p=0.0000$) των κυττάρων. Και σε αυτή τη συγκέντρωση τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλοιώσεις όμως **δεν είχαν συνοχή** (σαν άμμος) και υπήρχε κίνδυνος απομάκρυνσης κυττάρων με την αφαίρεση του PBS όπως και στη προηγούμενη συγκέντρωση.

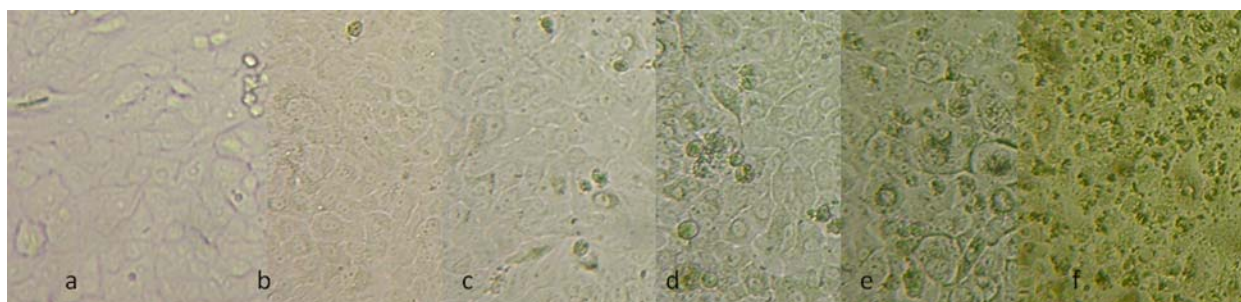
3.2.1.1.1.2.2.4 *Teucrium polium*

Στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 10) αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης μεθανολικών εκχυλισμάτων του φυτικού είδους *S. montana* σε A549 κύτταρα. Εφαρμόστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. Οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση του κυτταρικού θανάτου και των μορφών στις οποίες αυτός αναλύεται

αναφέρονται στον Πίνακα 7. Στην εικόνα 47 παρουσιάζονται οι μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων 24 ώρες μετά την επίδραση των διαλυμάτων.



Γράφημα 10: Το *T. polium* ενεργοποιεί την απόπτωση/νέκρωση των A549 κυττάρων όπως διαπιστώνεται έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και προσδιορισμό με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα δέχθηκαν την επίδραση αποξηραμένων και αναδιαλυμένων σε μη πλήρες Ham's F12K μεθανολικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 10, 20 mg mL⁻¹ για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της πρώιμης απόπτωσης, της όψιμης απόπτωσης και του κυτταρικού θανάτου εκφράστηκαν %. Οι μέσοι όροι που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το μάρτυρα ($P \leq 0.05$) συνοδεύονται από αστεράκι.



Εικόνα 47: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *T. polium* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση 10X40. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) 0 mg mL⁻¹, (b) 2 mg mL⁻¹, (c) 4 mg mL⁻¹, (d) 6 mg mL⁻¹, (e) 10 mg mL⁻¹, (f) 20 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K.

Πίνακας 7: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση % της επίδρασης του *T. polium* συγκέντρωσης 0, 2, 4, 6, 5, 10, 20 mg/mL σε A549 κύτταρα μετά από 24 ώρες

mg mL ⁻¹	Νέκρωση %	Πρώιμη απόπτωση %	Όψιμη Απόπτωση %	Ολικός κυτταρικός θάνατος %
0	0.28 ± 0.3	11.70 ± 0.6	7.37 ± 0.9	19.35 ± 0.6
2	0.42 ± 0.2	15.51 ± 6.8	11.62 ± 0.4	27.54 ± 7
4	3.19 ± 2.1	11.1 ± 2.1	21.02 ± 4.6	35.3 ± 4.5
6	1.11 ± 0.2	6.78 ± 0.5	15.5 ± 3.1	23.39 ± 3.8
10	13.44 ± 6.5	6.67 ± 1.6	66.30 ± 10.6	86.4 ± 2.5
20	9.61 ± 3.4	14.93 ± 6.2	21.41 ± 11.8	45.95 ± 14.15

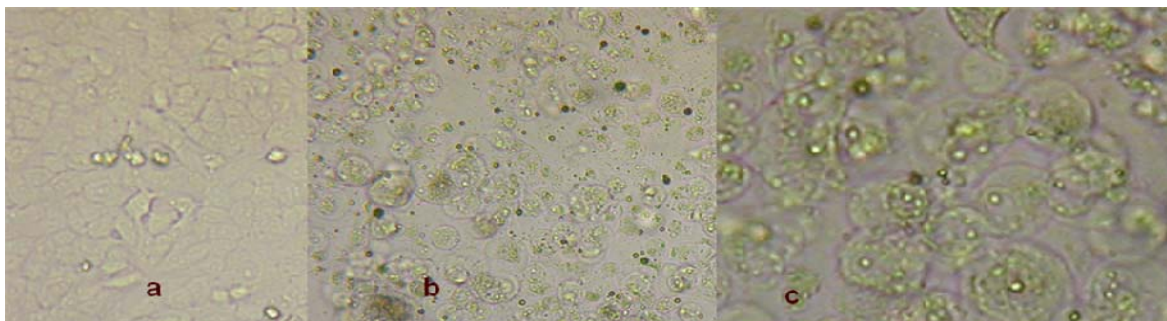
Συγκέντρωση 2 & 4 & 6 mg mL⁻¹: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση συγκριτικά με το Μάρτυρα .

Συγκέντρωση 10 mg mL⁻¹: Ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος ανέρχεται σε ποσοστό 86.4 ±2.5%, παρουσίασε σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα (Dunnett p=0.000) φαίνεται να οφείλεται κυρίως σε ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης, αλλά και σε νέκρωση των κυττάρων. Η όψιμη απόπτωση ανέρχεται σε ποσοστό 66.30 ± 10.6% (Dunnett p=0.000) και η νέκρωση σε ποσοστό 13.44 ± 6.5% (Dunnett p=0.020). Τα κύτταρα παρουσίασαν μορφολογικές αλλοιώσεις, ήταν διογκωμένα και παρουσιάζουν κολλώδη υφή.

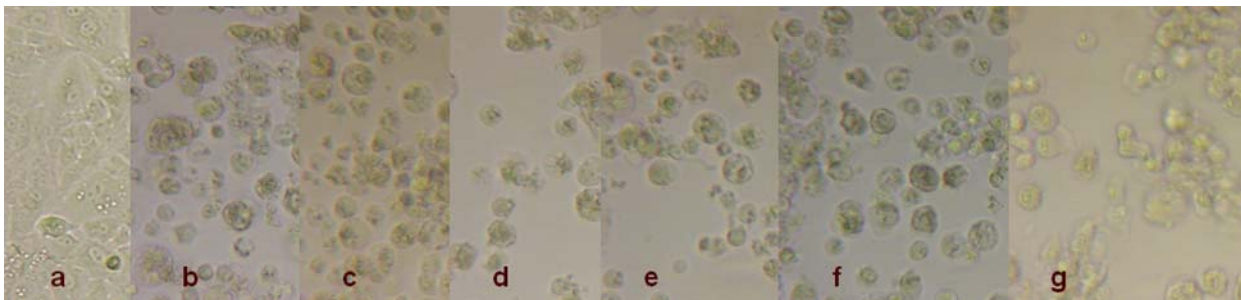
Συγκέντρωση 20 mg mL⁻¹: Το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου παρατηρήθηκε μειωμένο 45.95 ± 14.15% συγκριτικά με εκείνο της προηγούμενης συγκέντρωσης, παραμένει όμως στατιστικά σημαντικό (Dunnett p=0.015). Παρατηρούνται μορφολογικές αλλοιώσεις κατά την παρατήρηση με ανάστροφο μικροσκόπιο και το ίζημα των κυττάρων είχε λιγότερο κολλώδη υφή συγκριτικά με την προηγούμενη συγκέντρωση.

3.2.1.1.2.2.5 *Helleborus cyclophyllus*

Οι παρακάτω εικόνες (**Εικόνες 48-49**) αφορούν το ταπήτιο των κυττάρων, όπως αυτό παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή εκχυλίσματος φύλλων του *Helleborus cyclophyllus* συγκέντρωσης 100, 200, 400, 600, 900 και 1250 μg mL⁻¹ και 6 mg mL⁻¹ μη πλήρους Ham's F12K. Παρατηρήθηκαν αποκολλημένα κύτταρα, τα οποία σχημάτιζαν μάζες κυττάρων και είχαν χαρακτηριστικά διογκωμένο και στρογγυλό σχήμα. Το ίζημα των κυττάρων μετά τη συλλογή και έκπλυσή τους με PBS είχε κολλώδη υφή, πράσινο χρώμα και ήταν εμφανώς ποσοτικά μειωμένο συγκριτικά με το μάρτυρα, έπειτα από μακροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 48: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος φύλλων του *H. cyclophyllus* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες (a) 0 mg mL⁻¹, μεγέθυνση x100, (b) 6 mg mL⁻¹, μεγέθυνση x100, (c) 6 mg mL⁻¹, μεγέθυνση x400.

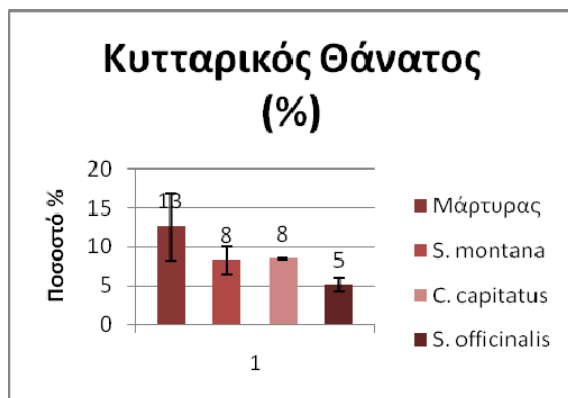


Εικόνα 49: Μορφολογικές αλλοιώσεις A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων του *H. cyclophyllus* παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο, μεγένθυση $\times 100$. Το ταπήτιο των κυττάρων παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την εφαρμογή. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες A549 κυττάρων (a) $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, β $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $600 \mu\text{g mL}^{-1}$, (f) $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ (g) $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K.

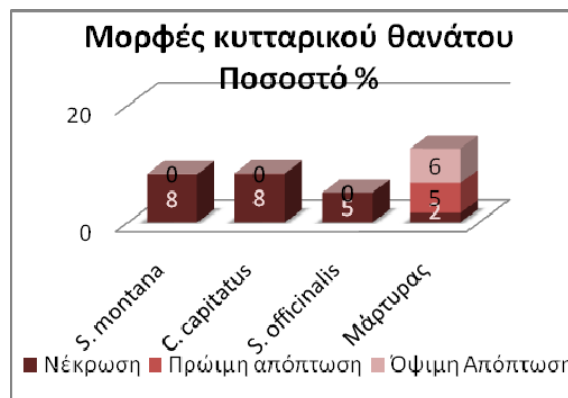
Σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν δεν λήφθηκαν μετρήσεις μετά τη σήμανση των κυττάρων με Annexin V-FITC, PI και τον προσδιορισμό τους με κυτταρομετρία ροής. Στο δείγμα δεν υπήρχαν αρκετά κύτταρα (10.000 κύτταρα) ώστε να ολοκληρωθεί η μέτρηση.

3.2.1.1.2.3 Αποτελέσματα 3ου πειράματος: Διερεύνηση της βιοδραστητικότητας αιθέριου ελαίου σε A549 κύτταρα

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ μη πλήρους Ham's F12K περιεκτικότητας $0.45 \mu\text{L mL}^{-1}$ σε DMSO σε A549 κύτταρα αναφέρονται στα παρακάτω γραφήματα (Γράφηματα 11-14).

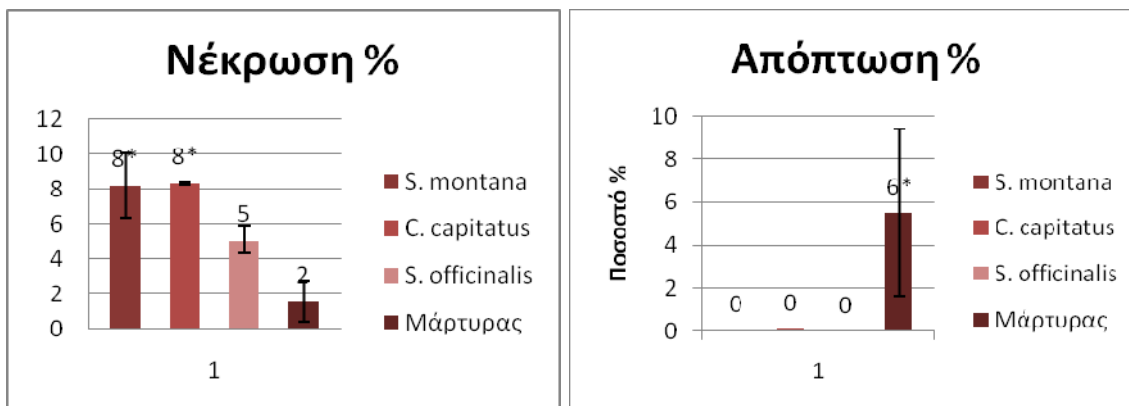


Γράφημα 12 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση κυτταρικού θανάτου 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$, περιεκτικότητας $0.45 \mu\text{L mL}^{-1}$ σε DMSO. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα.



Γράφημα 11: Κυτταρικός θάνατος όπως αυτός αναλύεται στα φαινόμενα που τον προκαλούν 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$, περιεκτικότητας $0.45 \mu\text{L mL}^{-1}$ σε DMSO.

Κυτταρικός θάνατος: Τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση των αιθέριων ελαίων παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου συγκριτικά με το μάρτυρα, όμως η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Ο κυτταρικός θάνατος των μεταχειρίσεων με αιθέριο έλαιο οφείλεται σε νέκρωση.



Γράφημα 13, Γράφημα 14: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση νέκρωσης (αριστερά) και απόπτωσης (δεξιά) 24 ώρες μετά την επίδραση με διαλύματα αιθέριων ελαίων συγκέντρωσης $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$, περιεκτικότητας $0.45 \mu\text{L mL}^{-1}$ σε DMSO. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από αστεράκι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με το Μάρτυρα.

Νέκρωση: Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό νέκρωσης διαπιστώθηκε έπειτα από επίδραση με το αιθέριο έλαιο των *S. montana* ($8.22 \pm 1.86 \%$) (Dunnett $p=0.011$) και *C. capitatus* ($8.34 \pm 0.05 \%$) (Dunnett $p=0.010$).

Απόπτωση: Στατιστικώς σημαντικά μικρότερο ποσοστό απόπτωσης διαπιστώθηκε έπειτα από επίδραση με τα διαλύματα των αιθέριων ελαίων συγκριτικά με τον μάρτυρα (Anova $p= 0.037$).



Εικόνα 50: Μικροσκοπική παρατήρηση ιζήματος κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση αιθέριου ελαίου συγκέντρωσης $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ για 24 ώρες (X 600).

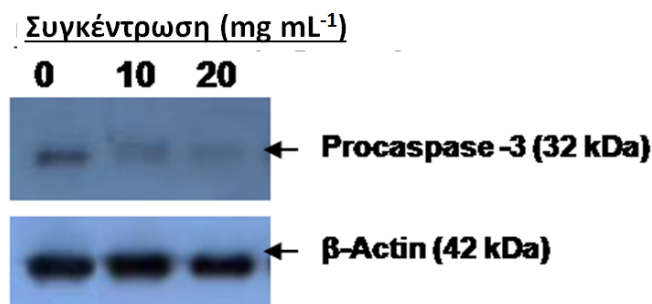
Αιθέριο έλαιο *O. vulgare hirtum* $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$: Κατά τη συλλογή και προετοιμασία των κυττάρων 24 ώρες μετά την επίδραση παρατηρήθηκε, ότι το ίζημα των κυττάρων είχε κολλώδη υφή. Υπήρχε δυσκολία στην επαναιώρηση των κυττάρων και τη δημιουργία ομοιογενούς αιωρήματος. Κατά τη

μέτρηση των δύο δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής δεν λήφθηκαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Δεν υπήρχε ο απαιτούμενος αριθμός κυττάρων στο δείγμα (10.000 κύτταρα) για να ολοκληρωθεί η μέτρηση. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση του ιζήματος των κυττάρων διαπιστώθηκε λύση των κυττάρων (**Εικόνα 50**). Ελάχιστα κύτταρα είχαν παραμείνει στο ίζημα.

3.2.1.1.2 Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot

3.2.1.1.2.1 Εκχύλισμα *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

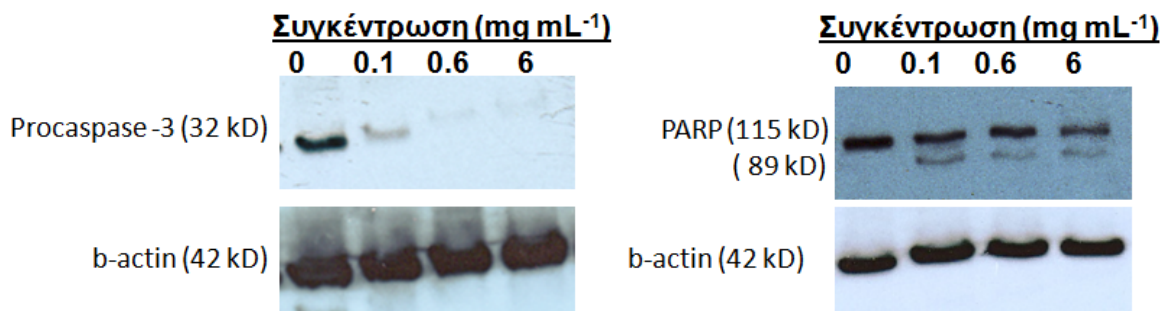
Όπως διακρίνεται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 51**) μείωση των επιπέδων της Προκασπάσης -3 παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την επέμβαση με εκχύλισμα του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 10 and 20 mg mL⁻¹ σε A549 κύτταρα.



Εικόνα 51: Μείωση επιπέδων της Προκασπάσης -3 σε A549 κύτταρα που δέχθηκαν επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (10 και 20 mg mL⁻¹) για 24 h όπως διαπιστώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot με την προσδιορισμό της β-Actin για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

3.2.1.1.2.2 Εκχύλισμα *H. cyclophyllus*

Μείωση των επιπέδων της Προκασπάσης -3 και διάσπαση της PARP (**Εικόνα 52**) διαπιστώθηκε 24 ώρες μετά την επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* σε A549 κύτταρα, συγκέντρωσης 0.1, 0.6, και 6 mg mL⁻¹.



Εικόνα 52: Μείωση επιπέδων της Προκασπάσης -3 (αριστερά) και διάσπαση της PARP (δεξιά) σε A549 κύτταρα που δέχθηκαν επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* (0.1, 0.6 και 6 mg mL⁻¹) για 24 h όπως διαπιστώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot με την προσδιορισμό της β-Actin για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

3.2.1.2 Έλεγχος μορφολογίας κυττάρων

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2.3.4 τα A549 κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλισμάτων των *S. horvatii* ssp. *macrophylla* και *H. cyclophyllus* σε δοσο- και χρονοεξατόμενο πείραμα υποβλήθηκαν σε χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης, χρώση May Grünwald- Giemsa, χρώση DAPI προκειμένου να μελετηθούν οι μορφολογικές τους διαφοροποιήσεις. Χρώση Oil red O χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παρουσίας κυστιδίων με λιπαρά συστατικά στα υπερκείμενα του *H. cyclophyllus*. Οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις που προκαλούν τα επιλεγμένα εκχυλίσματα σε φυσιολογικά κύτταρα (ινοβλάστες πνεύμονα) μελετήθηκε έπειτα από χρώση Παπανικολάου και DAPI.

3.2.1.2.1 Χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης

3.2.1.2.1.1 Επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 53**) παρουσιάζονται οι εικόνες των A549 κυττάρων του μάρτυρα και των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

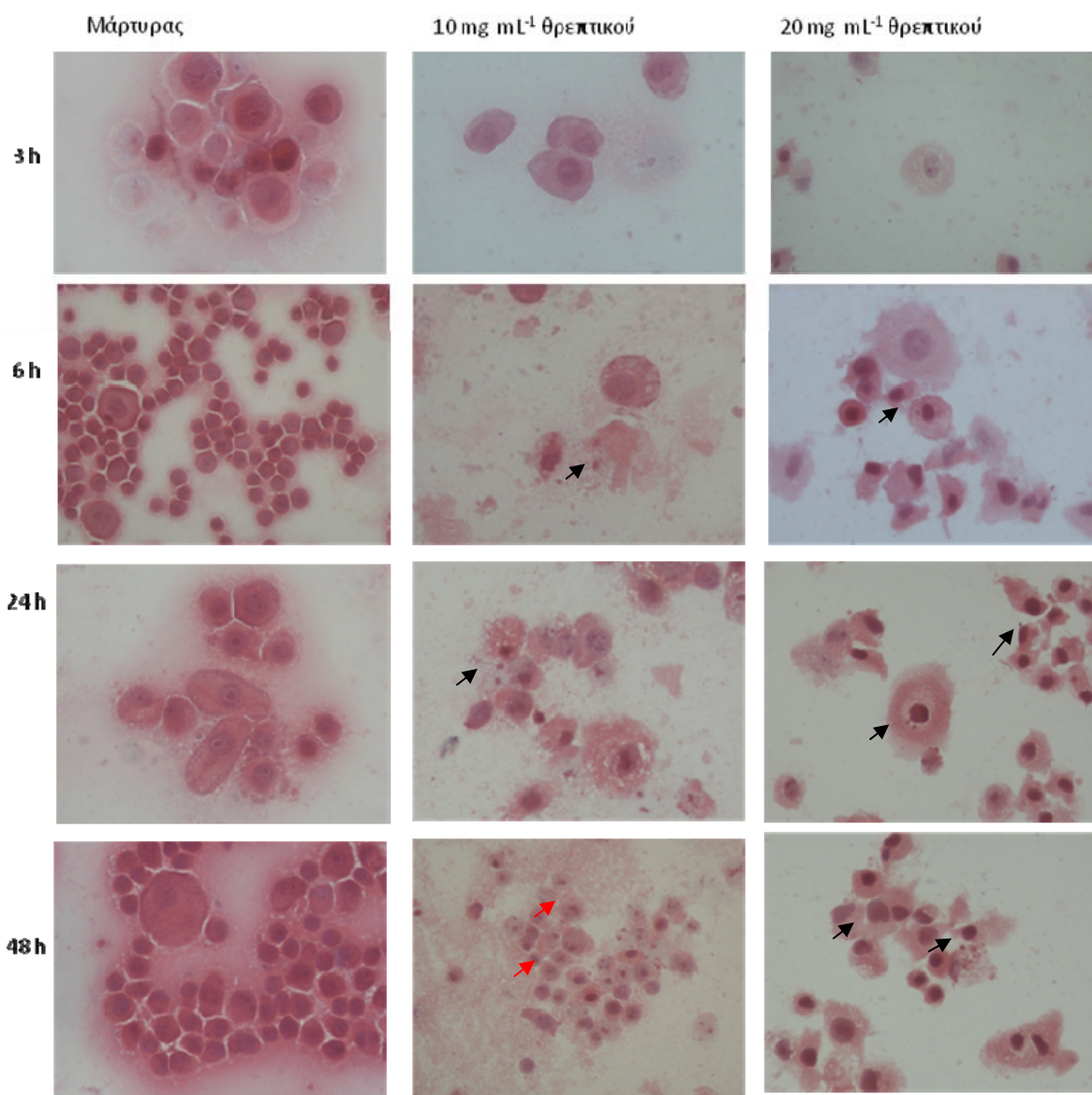
3h : Τα κύτταρα του μάρτυρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Στα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος συγκέντρωσης 10 mg mL^{-1} και 20 mg mL^{-1} αρχίζει να είναι ορατός ένας βαθμός συμπύκνωσης του πυρήνα, καθώς και ο σχηματισμός κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα.

6h: Παρατηρήθηκε φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων του μάρτυρα. Στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} (διακρίνεται ο σχηματισμός κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα, πυκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος, και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων. Στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} είναι εμφανής η πυκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος και ο σχηματισμός μικροπυρήνων.

24 h: Στο μάρτυρα παρατηρήθηκαν μικρά και μεγάλα φυσιολογικά A549 κύτταρα με ενεργό πυρήνιο (Εικόνα). Στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} παρατηρήθηκε αφρώδες κυτταρόπλασμα με κυτταροπλασματικά κενотоπία, πυκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων. Στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} διαπιστώθηκε η ίδια μορφολογία με λιγότερο αφρώδες κυτταρόπλασμα .

48 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα είναι φυσιολογικά ανεπτυγμένα (Εικόνα). Στα μισά περίπου κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση της συγκέντρωσης 10 mg mL^{-1} παρατηρήθηκαν διαταραχές στη χρωματίνη, όπως συμπυκνώματα χρωματίνης (Clumping Chromatin). Στη συγκέντρωση 20 mg

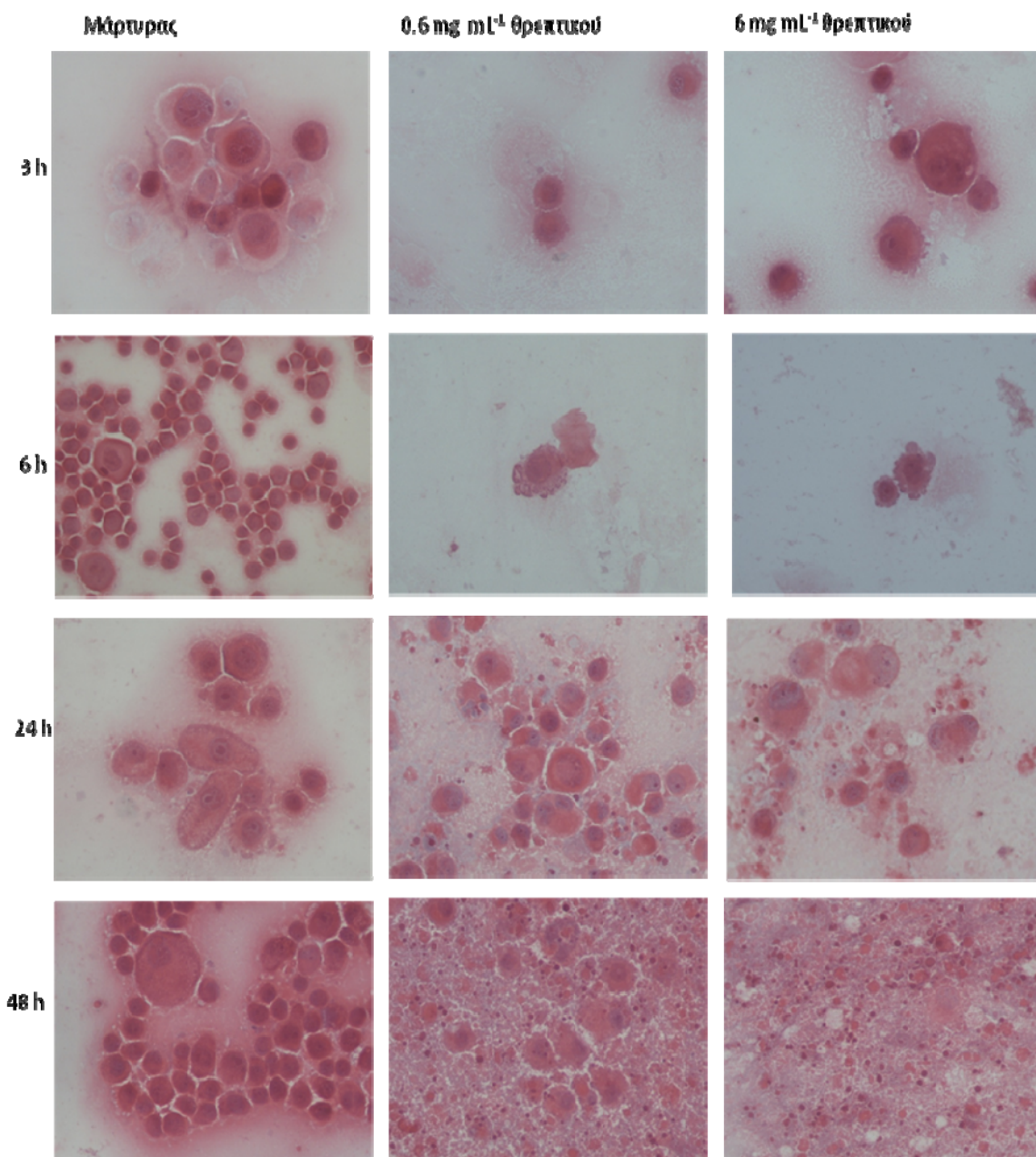
mL^{-1} δεν παρατηρήθηκε το προηγούμενο φαινόμενο, το κυτταρόπλασμα είναι αφρώδες και διακρίνεται πύκνωση των πυρήνων.



Εικόνα 53: Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL^{-1} μη πλήρους θρεπτικού για 3-6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης (μεγέθυνση $\times 600$). Όπου  αποπτωτικά σώματα,  σύμπυκνώματα χρωματίνης

3.2.1.2.1.2 Επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus*

Στην εικόνα που ακολουθεί (**Εικόνα 54**) παρουσιάζονται οι εικόνες των κυττάρων του μάρτυρα και των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus*.



Εικόνα 54: Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0-0.6-6 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 3-6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Αιματοξυλίνης –Ηωσίνης (μεγέθυνση x600).

3 h: Τα A549 κύτταρα του μάρτυρα έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά. Στα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του εκχυλίσματος παρατηρήθηκε κυματοειδής κυτταρική μεμβράνη κάτι που είναι πιο έντονο στη συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹ συγκριτικά με τη συγκέντρωση 0.6 mg mL⁻¹.

6 h: Δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις στα κύτταρα του μάρτυρα. Τόσο στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} όσο και στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική μεμβράνη έχει αποκτήσει κυματοειδή μορφή.

24 h: Παρατηρήθηκε φυσιολογική ανάπτυξη στα κύτταρα του μάρτυρα. Στα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του εκχυλίσματος παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλοιώσεις και σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις αφορούν την απώθηση του πυρήνα στην περιφέρεια του κυττάρου και το σχηματισμό ενός μεγάλου σε μέγεθος κυστιδίου στο κυτταρόπλασμα. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} διακρίνεται ένα διπύρρηνο κύτταρο με τα προαναφερόμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

48 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα δεν παρουσιάζουν μορφολογικές αλλοιώσεις. Τόσο στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} , όσο και στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} διακρίνονται άπειρα αποπτωτικά σωματίδια και κυτταρικά υπολείμματα. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

3.2.1.2.2 Χρώση May Grünwald- Giemsa

3.2.1.2.2.1 Επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

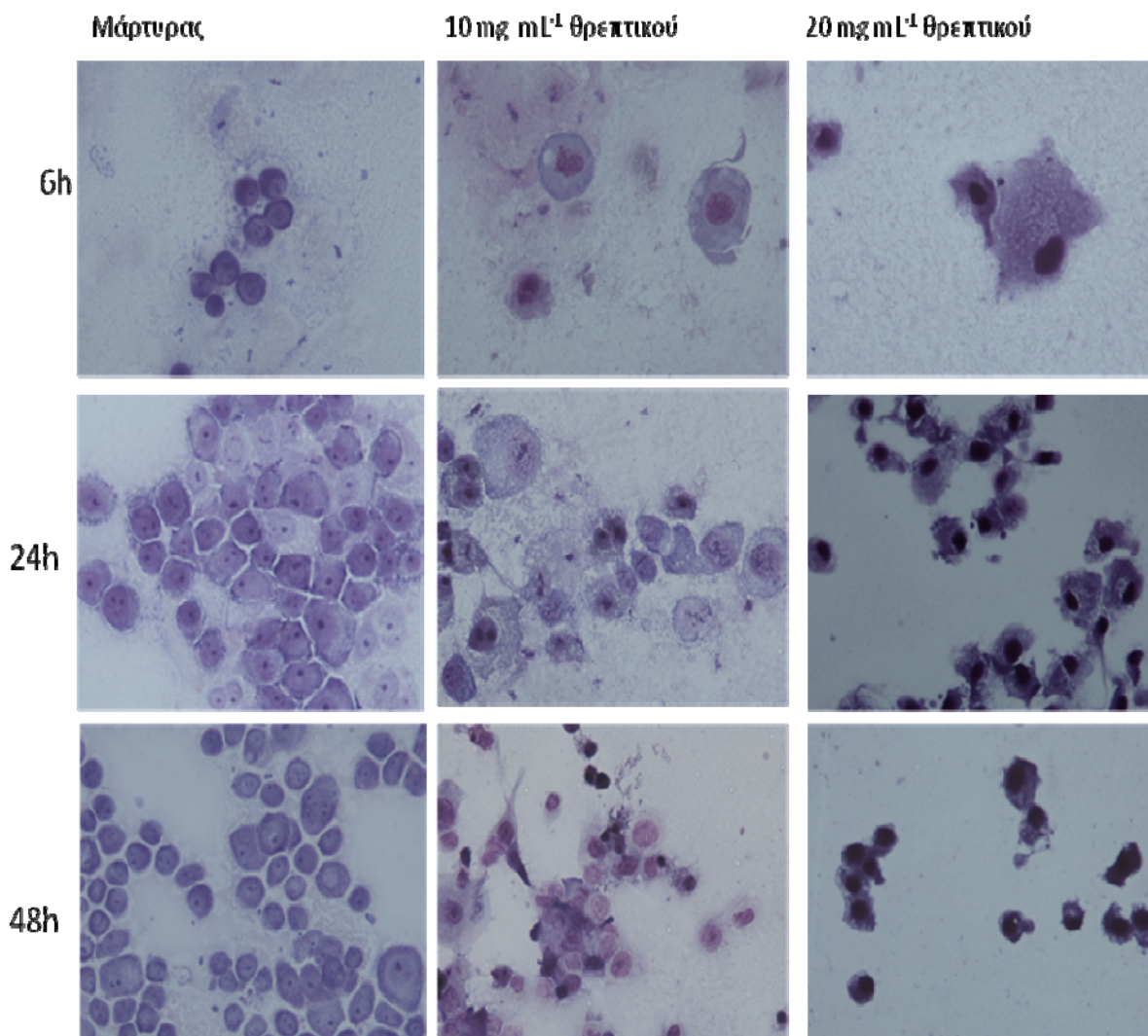
Οι εικόνες των κυττάρων του μάρτυρα και των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* παρουσιάζονται στη συνέχεια **(Εικόνα 55)**.

6 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} διακρίνεται ο σχηματισμός κενотоπιών στο κυτταρόπλασμα και οι πυρήνες αρχίζουν να φαίνονται πυκνωμένοι. Στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} παρατηρούνται ιδιαίτερα πυκνωμένοι πυρήνες και αφρώδες κυτταρόπλασμα.

24 h: Στο μάρτυρα παρατηρήθηκαν φυσιολογικά ανεπτυγμένα A549 κύτταρα. Στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} οι πυρήνες είναι πυκνωμένοι, διακρίνεται ο σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων, ενώ σε ορισμένα κύτταρα παρατηρούνται συμπυκνώματα χρωματίνης (Clumping Chromatin). Στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} παρατηρείται αφρώδες κυτταρόπλασμα, πύκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων.

48 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα είναι φυσιολογικά ανεπτυγμένα. Στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} παρατηρήθηκαν διάσπαρτοι πυκνωμένοι πυρήνες, πύκνωση του κυτταροπλάσματος και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων. Στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} διακρίνονται ιδιαίτερα

πυκνωμένοι πυρήνες, αφρώδες και πυκνωμένο κυτταρόπλασμα και σχηματισμός λίγων αποπτωτικών σωματίων.



Εικόνα 55: Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grünwald – Giemsa, μεγέθυνση x 600.

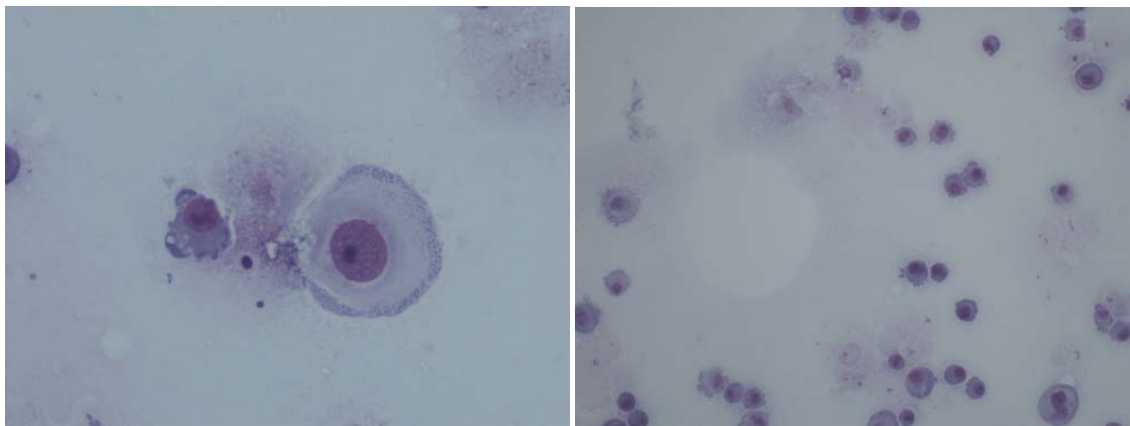
3.2.1.2.2 Επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus*

Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 56-57**) παρατηρούνται οι πρώτες μορφολογικές διαφοροποιήσεις των κυττάρων έξι (6) ώρες μετά την επίδραση με εκχύλισμα συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹.

Εικόνα 56: Στο μεγαλύτερο σε μέγεθος κύτταρο παρατηρείται ότι ενδοκυττάρια συστατικά περιφερειοποιούνται και η κυτταρική μεμβράνη αποκτά κυματοειδή μορφή. Στο μικρότερο σε

μέγεθος κύτταρο παρατηρείται, ότι η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει προεκβολές. Στις προεκβολές φαίνεται να συγκεντρώνεται το ενδοκυττάριο περιφερειοποιημένο υλικό.

Εικόνα 57: Στα περισσότερα κύτταρα διακρίνονται προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης. Φαίνεται ότι σχηματίζονται κυστίδια με τα οποία εξωκυττάρωνεται ενδοκυττάριο υλικό.



Εικόνα 56, Εικόνα 57: Μορφολογικές διαφοροποιήσεις A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL^{-1} μη πλήρους θρεπτικού για 6h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grünwald – Giemsa, εικόνα 56 (αριστερά) μεγέθυνση $\times 600$, εικόνα 57 (δεξιά) μεγέθυνση $\times 200$.

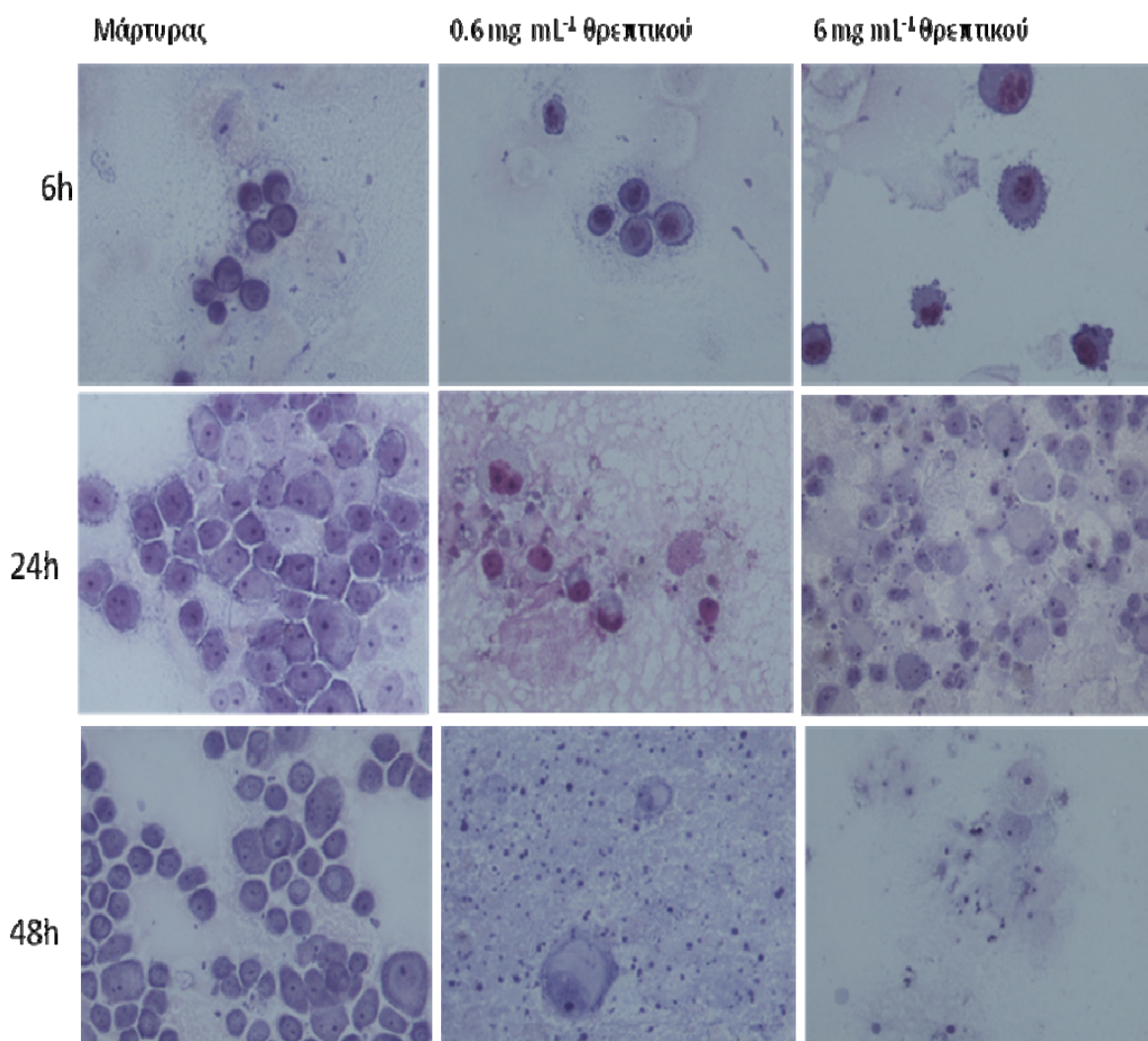
Στις εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνα 58**) παρατηρούνται μορφολογικές διαφοροποιήσεις των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus*.

6 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κυματοειδούς κυτταρικής μεμβράνης. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} το φαινόμενο είναι περισσότερο έντονο και η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει προεκβολές σαν να πρόκειται για σχηματισμό κυστιδίων με σκοπό την εξωκυττάρωση ενδοκυττάρων συστατικών.

24 h: Παρατηρήθηκε φυσιολογική ανάπτυξη στα κύτταρα του μάρτυρα. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} και περισσότερο έντονα στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} φαίνεται ότι ο πυρήνας των κυττάρων απωθείται στην περιφέρεια ενώ εντός του κυττάρου διακρίνεται ο σχηματισμός ενός μεγάλου σε μέγεθος κυστιδίου. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται η παρουσία δύο πυρήνων εντός του κυττάρου. Και στις δύο συγκεντρώσεις φαίνεται σαν να έχουν σχηματιστεί αποπτωτικά σωμάτια.

48 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα δεν παρουσιάζουν μορφολογικές αλλοιώσεις. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} παρατηρείται ένα κύτταρο με απωθημένο τον πυρήνα στην περιφέρεια και

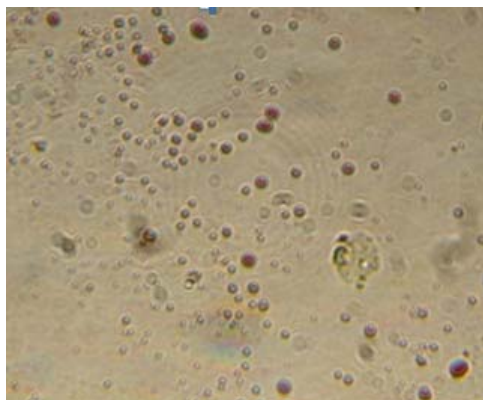
σχηματισμός άπειρων αποπτωτικών σωματίων. Ο σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων φαίνεται να διακρίνεται και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} .



Εικόνα 58: Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0, 0.6, 6 mg mL^{-1} μη πλήρους θρεπτικού για 6-24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση May Grünwald - Giemsa.

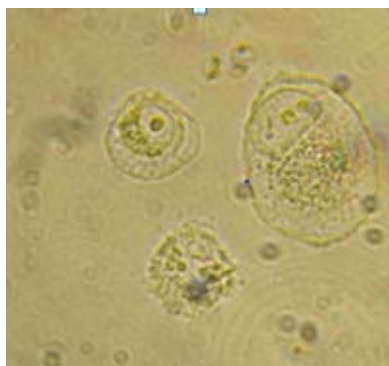
3.2.1.2.3 Χρώση Oil red O - Αιματοξυλίνης

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 59) παρατηρείται υλικό που απομονώθηκε και χρώστηκε από το υπερκείμενο των A549 κυττάρων μετά από τέσσερις (4) ώρες επίδρασης με εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL^{-1} .



Εικόνα 59: Κυστίδια που απομονώθηκαν από τον υπερκείμενο χώρο των A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL^{-1} μη πλήρους θρεπτικού για 4 h. Τα κυστίδια παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με Oil red O – Αιματοξυλίνη.

4 h Υπερκείμενο: Από το υπερκείμενο των κυττάρων φαίνεται ότι απομονώθηκαν κυστίδια τα οποία έπειτα από χρώση Oil red O – Αιματοξυλίνης έχουν μία κοκκινωπή απόχρωση.



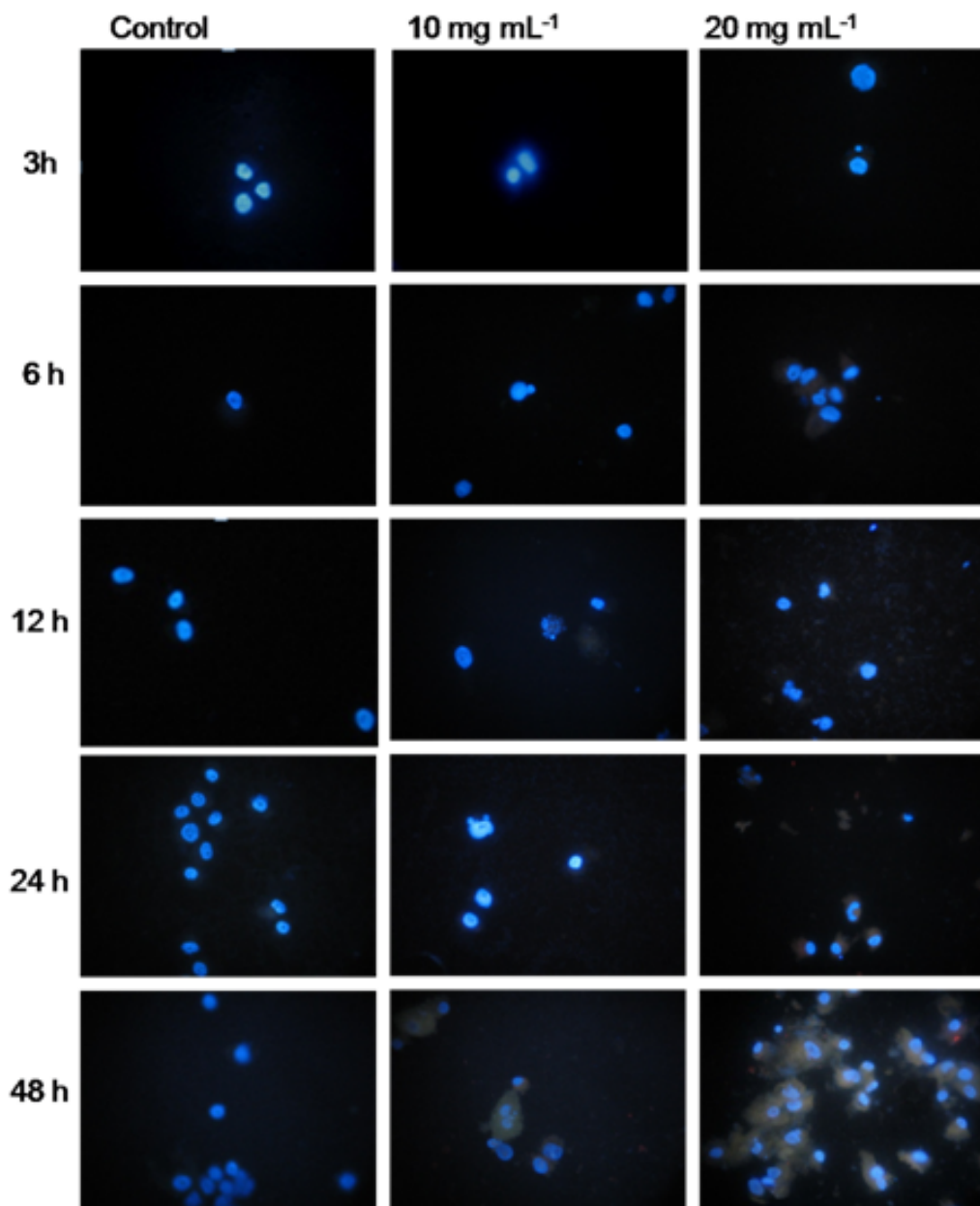
Εικόνα 60: Κύτταρα A549 με χρώση και χωρίς χρώση Oil red O - Αιματοξυλίνης έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.6 mg mL^{-1} για 24 h. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο (μεγέθυνση $\times 400$).

24 h: Ελάχιστα A549 κύτταρα έχουν παραμείνει στο ταπήτιο, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.6 mg mL^{-1} για 24 h. Σε αυτά που παρέμειναν παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφοροποιήσεις. Τα κύτταρα έχουν αποκτήσει στρογγυλό σχήμα και ο πυρήνας φαίνεται απωθημένος στην περιφέρεια. Στο μη κεχρωσμένο κύτταρο (**Εικόνα 60**) φαίνεται σαν φυτικής προέλευσης συστατικά (πράσινου χρώματος) να έχουν περάσει στο εσωτερικό του κυττάρου και να συγκεντρώνονται σε μία σφαιρική περιοχή, η οποία εντοπίζεται δίπλα στον πυρήνα. Αυτός ο σχηματισμός εντοπίζεται και εξωκυττάρια. Το oil red O είναι λιποδιαλυτή χρωστική. Στο κεχρωσμένο κύτταρο φαίνεται, ότι περιέχονται λιπόφιλα συστατικά λόγω της κόκκινης χρώσης τους.

3.2.1.2.4 Χρώση DAPI

3.2.1.2.4.1 Επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* στη μορφολογία των A549 πυρήνων

Στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 61) απεικονίζονται οι πυρήνες των A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* έπειτα από χρώση DAPI και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 61: Πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0, 10 ,20 mg mL⁻¹ για 3, 6, 12, 24, 48 ώρες. Οι πυρήνες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (x 400)

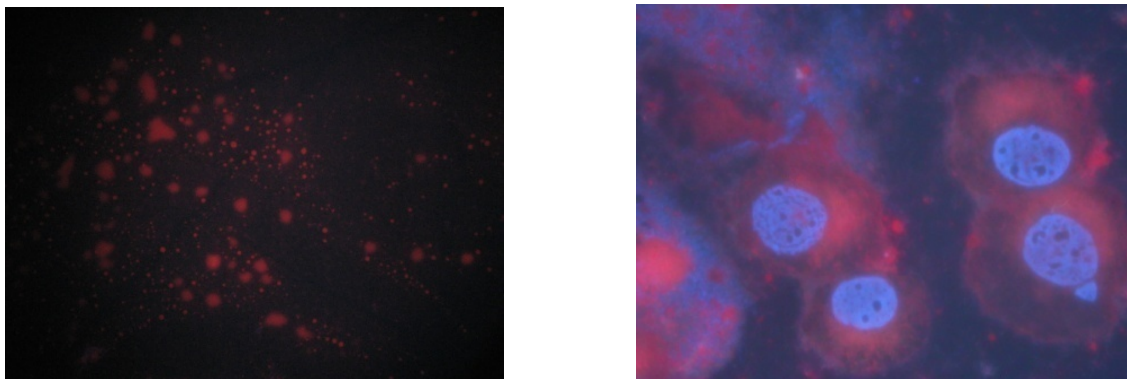
3 h: Οι πυρήνες του μάρτυρα φαίνονται φυσιολογικοί. Τόσο στη συγκέντρωση 10 mg mL^{-1} όσο και στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} είναι εμφανής μία πύκνωση των πυρήνων, ενώ στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} , διακρίνεται ο σχηματισμός μικροπυρήνων.

6 h, 12h, 24h: Ενώ οι πυρήνες στα κύτταρα του μάρτυρα είναι φυσιολογικοί, στα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του εκχυλίσματος ($10, 20 \text{ mg mL}^{-1}$) είναι πυκνωμένοι και διακρίνεται ο σχηματισμός μικροπυρήνων. Η παρουσία φυτικής προέλευσης συστατικών στο κυτταρόπλασμα των κυττάρου διακρίνεται έπειτα από 24 ώρες επίδρασης στη συγκέντρωση 20 mg mL^{-1} .

48h: Εκτός από την πύκνωση των πυρήνων και το σχηματισμό μικροπυρήνων στα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του εκχυλίσματος ($10, 20 \text{ mg mL}^{-1}$) φαίνεται ότι φυτικής προέλευσης φθορίζοντα συστατικά έχουν περάσει στο κυτταρόπλασμα.

3.2.1.2.4.2 Επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* στη μορφολογία των πυρήνων (A549 κύτταρα)

Η εικόνα που ακολουθεί (**Εικόνα 62**) αφορά το αποξηραμένο MeOH εκχύλισμα, όπως παρατηρείται σε μικροσκόπιο φθορισμού, ενώ η εικόνα 46 αφορά πυρηνική χρώση των A549 κυττάρων με DAPI, έπειτα από επίδραση με εκχύλισμα συγκέντρωσης 6 mg mL^{-1} για 12 h



Εικόνα 62: Αποξηραμένο μεθανολικό εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* έπειτα από χρώση DAPI και πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL^{-1} για 12 h (αριστερά) όπως αυτά παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (x ?).

Εκχύλισμα *H. cyclophyllus*: Τα φυτικής προέλευσης συστατικά του *H. cyclophyllus* που περιέχονται στο MeOH εκχύλισμα παρουσιάζουν κόκκινο φθορισμό, έπειτα από παρατήρησή τους με φίλτρο DAPI σε μικροσκόπιο φθορισμού.

***H. cyclophyllus* 6 mg mL^{-1} για 12 h:** Στα A549 κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* 6 mg mL^{-1} για 12 h είναι δυνατή η παρατήρηση της παρουσίας φυτικής προέλευσης

συστατικών φθορίζοντων συστατικών του εκχυλίσματος στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Περισσότερο έντονος είναι ο χρωματισμός στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου που βρίσκεται σε συνέχεια με τον πυρήνα των κυττάρων. Οι πυρήνες παρουσιάζουν ενεργά μεταγραφικές περιοχές (πυρήνια) και διακρίνεται ο σχηματισμός ενός θραύσματος στον πυρήνα ενός κυττάρου.

Οι εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνα 63**) απεικονίζουν την πυρηνική χρώση των A549 κυττάρων με DAPI, όπως αυτή παρατηρείται σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από επίδραση των κυττάρων με εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 6 mg mL⁻¹ για 12 h.

3 h: Οι πυρήνες του μάρτυρα φαίνονται φυσιολογικοί. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL⁻¹ διακρίνονται πυκνωμένοι πυρήνες, σχηματισμός μικροπυρήνων και παρουσία διπύρηνων κυττάρων. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹ παρατηρήθηκε πύκνωση των πυρήνων, σχηματισμός μικροπυρήνων και παρουσία φυτικής προέλευσης φθορίζοντων συστατικών στο εσωτερικό του κυττάρου.

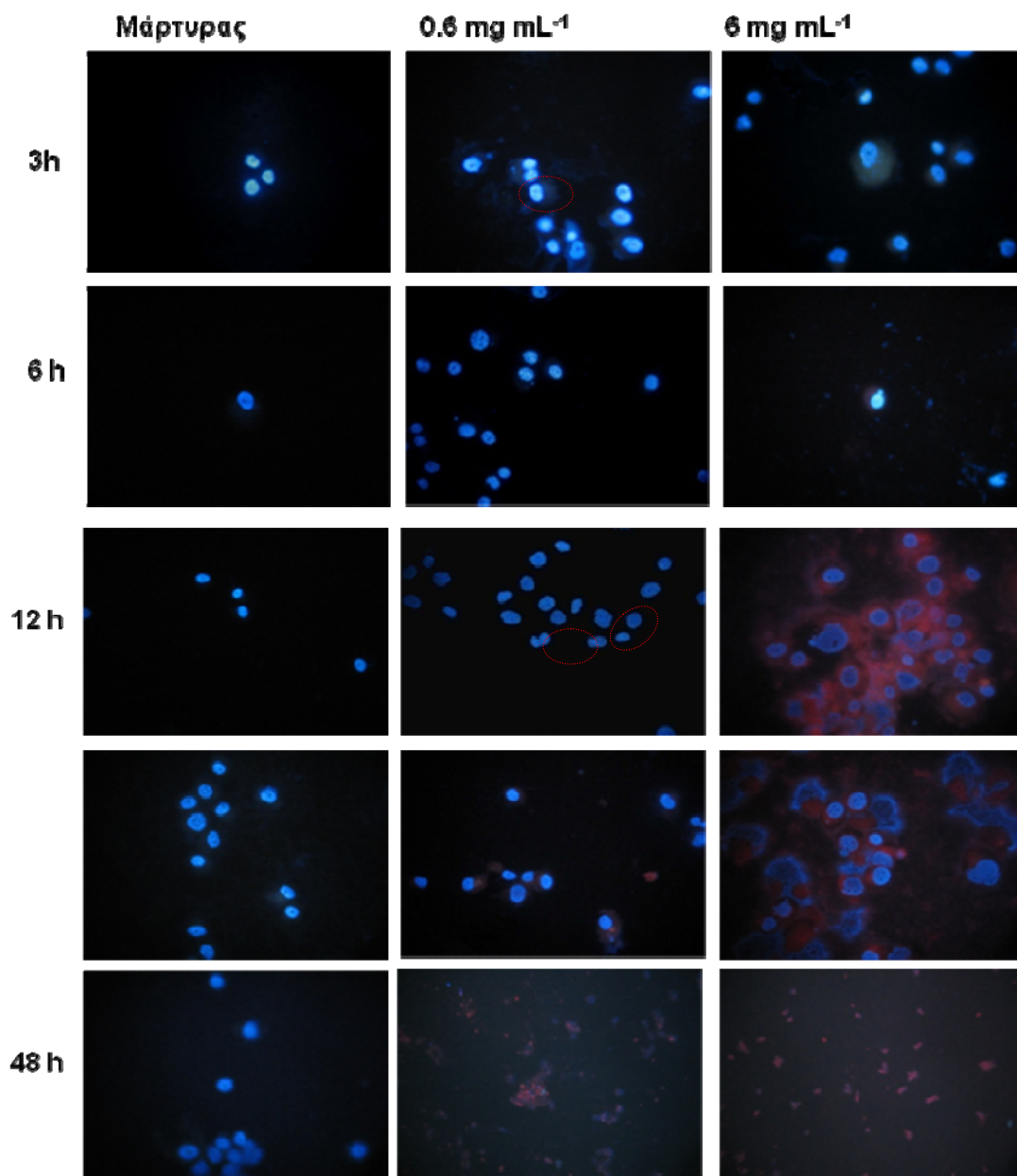
6 h: Και στις δύο συγκεντρώσεις 10 mg mL⁻¹ και 20 mg mL⁻¹ παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μικροπυρήνων, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση διακρίνεται η παρουσία φυτικής προέλευσης συστατικών στο κυτταρόπλασμα.

12 h: Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL⁻¹ παρατηρήθηκε πύκνωση των πυρήνων, σχηματισμός μικροπυρήνων και η παρουσία διπύρηνων κυττάρων. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹ παρατηρήθηκαν τόσο πυκνωμένοι όσο και διογκωμένοι πυρήνες, σχηματισμός μικροπυρήνων και παρουσία ενεργά μεταγραφικών περιοχών (πυρήνια) ενώ στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων διαπιστώθηκε η παρουσία φυτικής προέλευσης συστατικών (κόκκινο χρώμα).

24 h: Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL⁻¹ παρατηρήθηκε πύκνωση των πυρήνων, σχηματισμός μικροπυρήνων και παρουσία φυτικής προέλευσης φθορίζοντων συστατικών στο κυτταρόπλασμα. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 mg mL⁻¹ το έντονο κόκκινο χρώμα στο κυτταρόπλασμα δείχνει ότι έχουν περάσει περισσότερα φυτικής προέλευσης συστατικά στο κυτταρόπλασμα. Διακρίνονται διογκωμένοι πυρήνες με πολλά πυρήνια, πυκνωμένοι πυρήνες και σχηματισμός μικροπυρήνων. Σε ορισμένοι απωθημένους πυρήνες στην περιφέρεια του κυττάρου με σχήμα ημισελήνου, διακρίνεται περιφερειακή διάταξη της ευχρωματίνης και φαίνεται σαν να έχει καταστραφεί η

πυρηνική μεμβράνη και το περιεχόμενο του πυρήνα να εκχύνεται στο περιβάλλον του (καρυόλυση).

48 h: Τόσο στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} όσο και στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} παρατηρούνται πυρηνικά και κυτταροπλασματικά υπολείμματα.

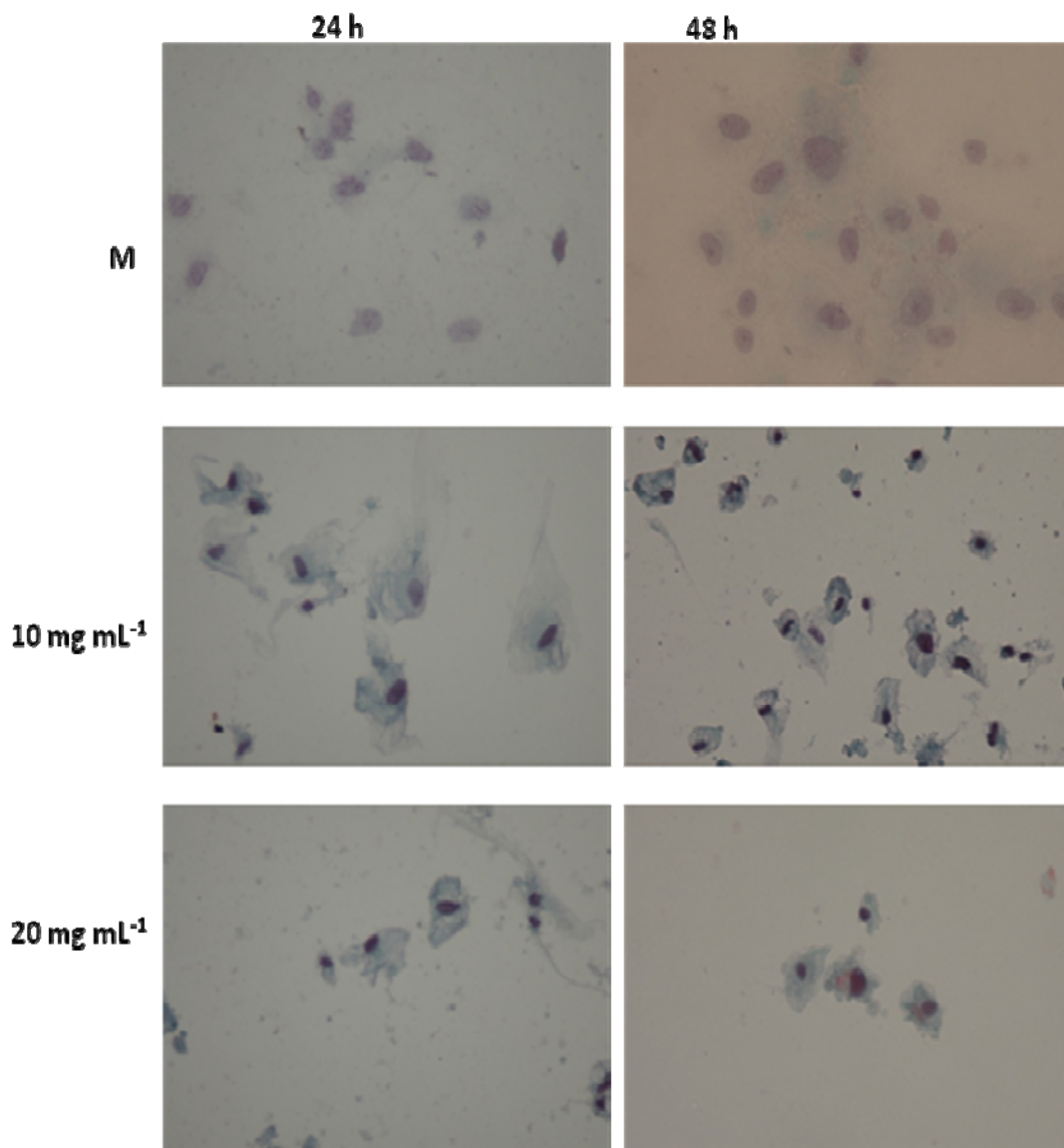


Εικόνα 63: Πυρηνική χρώση με DAPI των A549 κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0, 0.6, 6 mg mL^{-1} για 3, 6, 12, 24, 48 ώρες. Οι πυρήνες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού ($\times 400$). Οι κύκλοι δείχνουν διπύρρηνα κύτταρα με σχηματισμό μικροπυρήνων.

3.2.1.2.5 Χρώση Παπανικολάου

3.2.1.2.5.1 Επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* στη μορφολογία ινοβλαστών

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 64) παρατηρούνται μορφολογικές διαφοροποιήσεις των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus*.



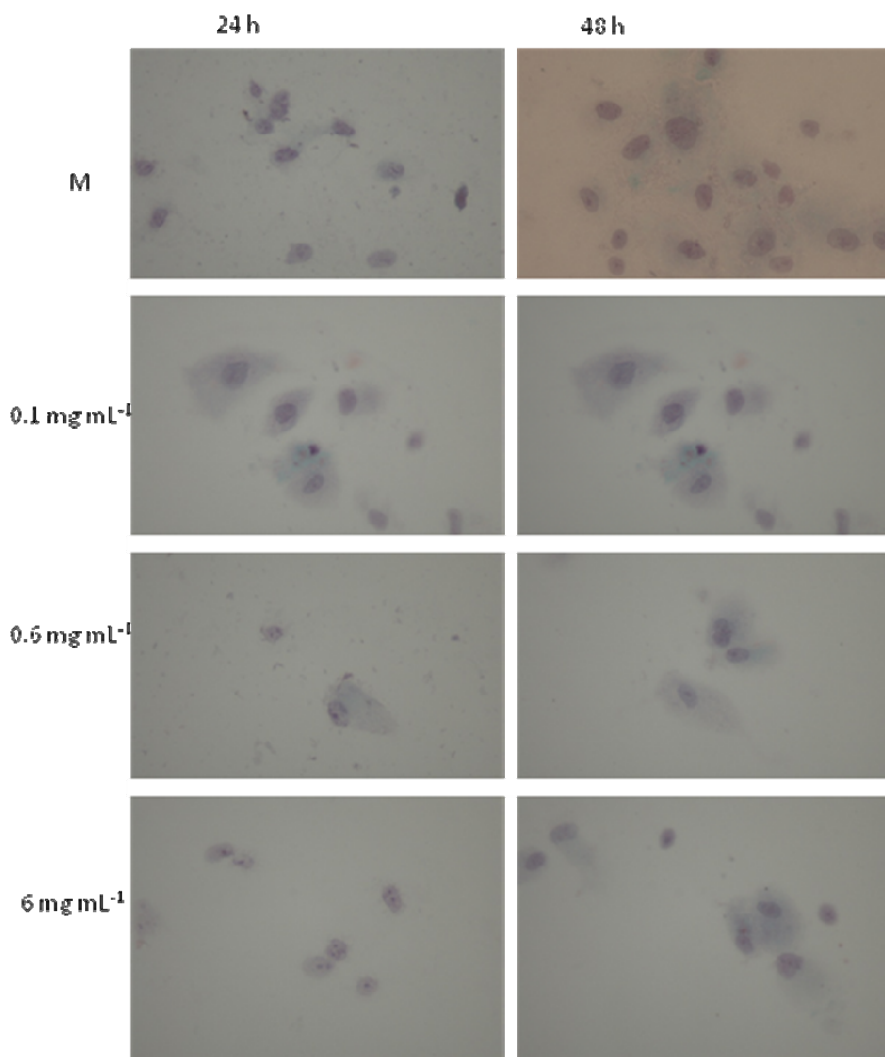
Εικόνα 64: Μορφολογία A549 κυττάρων έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0-10-20 mg mL⁻¹ μη πλήρους θρεπτικού για 24-48 h. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση Παπανικολάου, μεγέθυνση x 400.

24 h : Τα κύτταρα του μάρτυρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Τόσο στη συγκέντρωση 10 mg mL⁻¹ όσο και στη συγκέντρωση 20 mg mL⁻¹ οι ινοβλάστες παρουσίασαν πυκνωμένους πυρήνες και αφρώδες κυτταρόπλασμα.

48 h : Στα κύτταρα του μάρτυρα παρατηρήθηκε φυσιολογική ανάπτυξη. Και στις δύο συγκεντρώσεις 10 mg mL^{-1} και 20 mg mL^{-1} οι ινοβλάστες παρουσίασαν πυκνωμένους πυρήνες και αφρώδες κυτταρόπλασμα.

3.2.1.2.5.2 Επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus* στη μορφολογία ινοβλαστών

Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 65**) παρατηρούνται μορφολογικές διαφοροποιήσεις των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος του *H. cyclophyllus*.



Εικόνα 65: Μορφολογία πνευμονικών ινοβλαστών έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος *H. cyclophyllus* συγκέντρωσης 0.1 , 0.6 , 6 mg mL^{-1} μη πλήρους θρεπτικού για 24 - 48 h . Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από χρώση, μεγέθυνση $\times 400$.

24 h : Τα κύτταρα του μάρτυρα, όπως και τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση της συγκέντρωσης 0.1 mg mL^{-1} φαίνεται να έχουν αναπτυχθεί φυσιολογικά. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1}

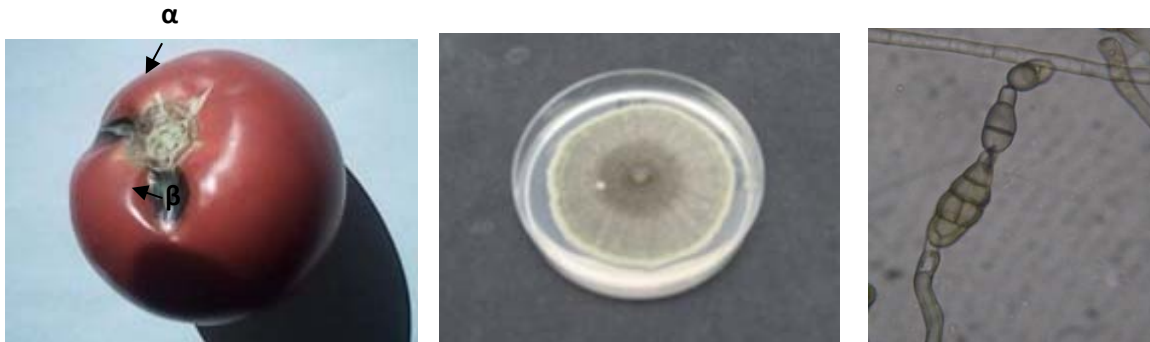
διακρίνεται λίγο οιδηματώδες κυτταρόπλασμα και σχηματισμός πυρηνίων στους πυρήνες των κυττάρων. Στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} , ενώ η μορφολογία των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος είναι φυσιολογική, στους πυρήνες των κυττάρων εμφανίζονται ηωσινόφιλα (ροζ) και βασεόφιλα (μοβ) πυρήνια.

48 h: Τα κύτταρα του μάρτυρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Στη συγκέντρωση 0.1 mg mL^{-1} τα κύτταρα εμφανίζονται φυσιολογικά με λίγο οιδηματώδες κυτταρόπλασμα. Στη συγκέντρωση 0.6 mg mL^{-1} λίγα κύτταρα παρουσιάζουν αλλοιώσεις, ενώ σε ορισμένα είναι εμφανές το πυρήνιο. Στη συγκέντρωση 6 mg mL^{-1} υπάρχουν κύτταρα με ανεπηρέαστους πυρήνες και λίγο ενδοκυττάριο οίδημα.

3.3 Αποτελέσματα βιοδοκιμών σε φυτοπαθογόνους μύκητες

3.3.1 Απομόνωση και καλλιέργεια φυτοπαθογόνων

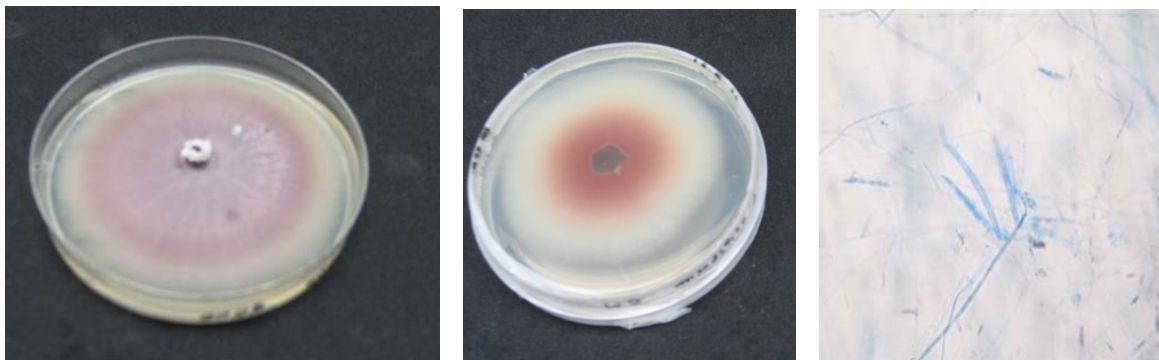
Οι προσβλημένοι καρποί τομάτας από τους οποίους απομονώθηκαν τα παθογόνα, οι καλλιέργειες των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς επίσης τα μικροσκοπικά τους χαρακτηριστικά διαφέρονται στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνες 66-68**)



Εικόνα 66: *A. alternata* (**α**) προσβλημένος καρπός τομάτας (**β**) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA (**γ**) μικροσκοπική παρατήρηση αγενούς καρποφορίας



Εικόνα 67: *B. cinerea* (**α**) προσβλημένος καρπός τομάτας (**β**) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA (**γ**) μικροσκοπική παρατήρηση αγενούς καρποφορίας



Εικόνα 68: *F. oxysporum f.sp. lycopersici* (**α&β**) μακροσκοπική παρατήρηση καλλιέργειας σε PDA (**γ**) μικροσκοπική παρατήρηση μακροκονιδίων.

3.3.2 Αποτελέσματα εκτίμησης αντιμυκητικής δράσης του *S. horvatii* spp. *macrophylla*

3.3.2.1 Μέθοδος διάχυσης σε στερεό μέσο

3.3.2.1.1 Αιθέριο έλαιο

Στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου (**Πίνακας 8**) και μεθανολικού εκχυλίσματος (**Πίνακας 9**) του *S. horvatii* spp. *macrophylla* αναφορικά με την ανάπτυξη των στελεχών που συμμετείχαν στις βιοδοκιμές την 6^η μέρα μετά την επίδραση (**Εικόνα 69**).

Πίνακας 8: Αντιμυκητική δράση αιθέριου ελαίου του <i>S. horvatii</i> spp. <i>macrophylla</i> Μ.Ο. ζώνης αναστολής (mm) και τυπική απόκλιση						
Μεταχείριση	Συγκέντρωση αιθέριου ελαίου (μl/ml)					
	2	4	6	8	10	15
Μάρτυρας	-	-	-	-	-	- a
DMSO 2%	-	-	-	-	-	-a
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	±	+	10±1 c
<i>B. cinerea</i>	-	-	-	±	+	9.7±0.6 c
<i>A. alternata</i>	-	-	-	±	+	8.2±0.3 b
± Πρώτη ορατή αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα + Αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα - Δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην ανάπτυξη του μύκητα Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους LSD (p=0,05)						

Μάρτυρας – DMSO 2%: Το DMSO συγκέντρωσης 2% δεν επηρέασε την ανάπτυξη των μυκήτων.

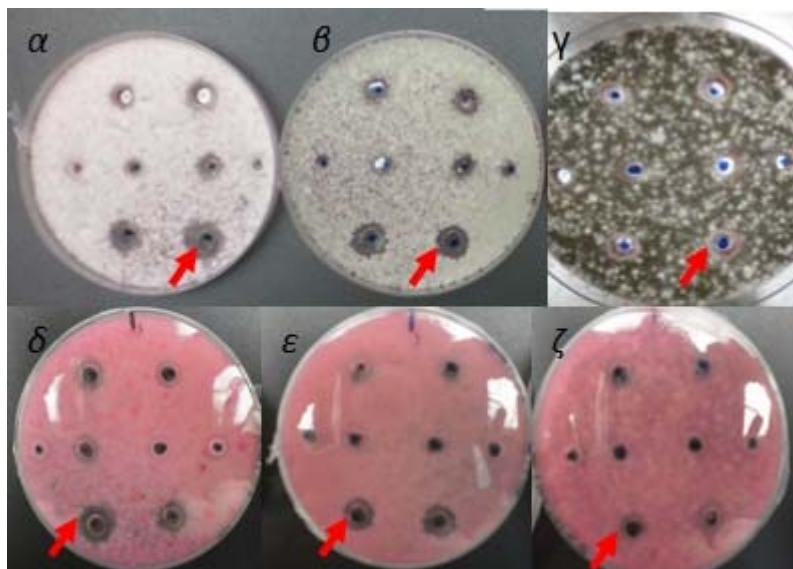
Συγκεντρώσεις 2-4-6 μl mL⁻¹: Δεν παρατηρήθηκε κάποια αναστολή στην ανάπτυξη του θαλλού των μυκήτων που συμμετείχαν στις βιοδοκιμές.

Συγκέντρωση 8 μl mL⁻¹: Καταγράφηκε μία πρώτη ελάχιστη αναστολή της ανάπτυξης του θαλλού των ειδών *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. alternata*.

Συγκέντρωση 10 μl mL⁻¹: . Η αναστολή της ανάπτυξης του θαλλού ήταν ευκρινής και για τα 3 στελέχη.

Συγκέντρωση 15 μl mL⁻¹: Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (one way Anova p= 0.00) αναφορικά με την επίδραση του αιθέριου ελαίου αυτής της συγκέντρωσης στην ανάπτυξη του θαλλού των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές. Αν και μεγαλύτερη επίδραση

σημειώθηκε στην ανάπτυξη του *F. oxysporum* ($10 \pm 1\text{mm}$) αυτή δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά (Duncan $p=0.6$) από την επίδραση *B. cinerea* ($9.7 \pm 0.6\text{ mm}$). Σημαντική ήταν επίσης η αναστολή του μύκητα *A. alternata* ($8.2 \pm 0.3\text{ mm}$).



Εικόνα 69: Τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αντιμυκητικής δράσης αιθέριου ελαίου του *S. horvati* spp. *macrophylla* με τη μέθοδο της διάχυσης σε εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το βέλος σημειώνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση $15\mu\text{L mL}^{-1}$. **α,δ:** *F. oxysporum*, **β,ε:** *B. cinerea*, **γ,ζ:** *A. alternata*.

3.3.2.1.2 Μεθανολικό εκχύλισμα

Στον πίνακα (Πίνακα 9) που ακολουθεί αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του μεθανολικού εκχυλίσματος

Πίνακας 9: Αντιμυκητική δράση μεθανολικού εκχυλίσματος του <i>S. horvati</i> spp. <i>macrophylla</i>						
Μεταχείριση	Συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ($\text{mg ξηρού Φ.Ι. mL}^{-1}$)					
	2	4	6	8	10	20
Μάρτυρας						
MeOH						
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B. cinerea</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. alternata</i>	-	-	-	-	-	-
- Δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην ανάπτυξη του μύκητα						

Μάρτυρας – MeOH: Η MeOH που δέχθηκε την ίδια μεταχείριση με το MeOH εκχύλισμα δεν επηρέασε την ανάπτυξη των μυκήτων.

Συγκεντρώσεις 2 έως $20\mu\text{L mL}^{-1}$: Δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη του θαλλού των μυκήτων που συμμετείχαν στις βιοδοκιμές.

3.3.2.2 Αποτελέσματα επίδρασης πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου

3.3.2.2.1 1ο Πείραμα: 0-2.5-5-10-15-20 μL /τρυβλίο

Τα αποτελέσματα της επίδρασης πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου στη μυκηλιακή ανάπτυξη (mm) των *S. horvatii* spp. *macrophylla* στους μύκητες *A. alternata*, *B. cinerea* και *F. oxysporum* ssp. *lycopersici* μετά από 7 μέρες αναφέρονται σε πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Μυκηλιακή ανάπτυξη των *A. alternata*, *B. cinerea* και *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp *macrophylla* συγκέντρωσης 0-2.5-5-10-15-20 μL /τρυβλίο

Συγκέντρωση	<i>A. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>
0	36 a	68.3 $\pm$ 2.9 a	87 $\pm$ 0 a
2.5	20.7 $\pm$ 0.6 b	11 $\pm$ 1 b	62.7 $\pm$ 20.5 b
5	6.3 $\pm$ 0.6 c	6.3 c	20.3 $\pm$ 5.7 c
10	6 c	6 c	18 $\pm$ 10.4 c
15	6 c	6 c	17.7 $\pm$ 2.5 c
20	6 c	6 c	18.7 $\pm$ 5.8 c

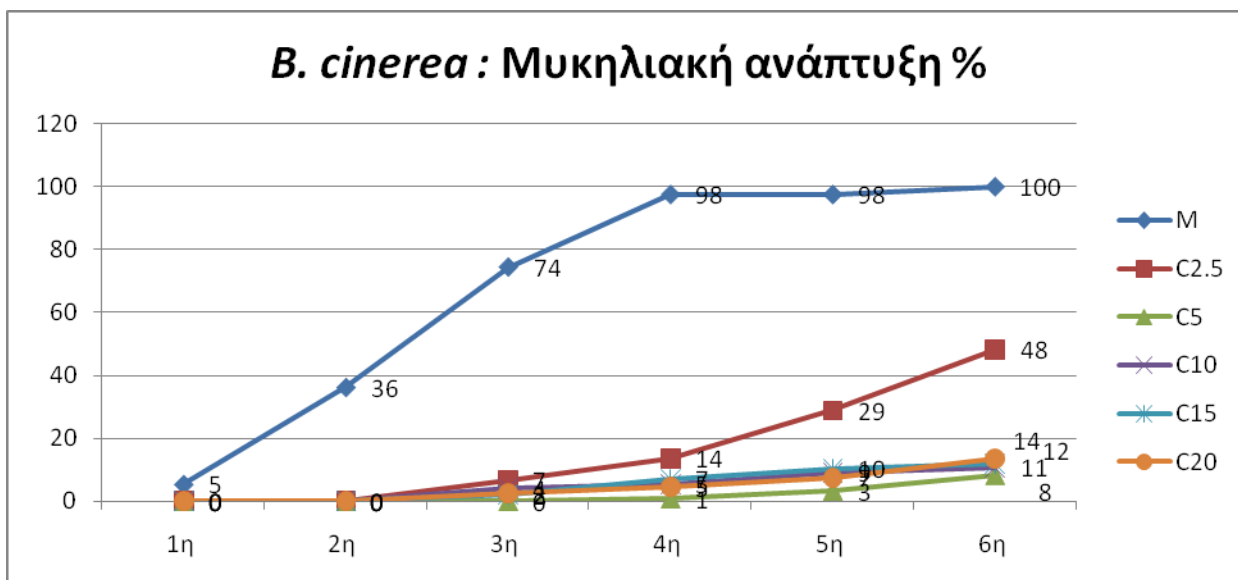
Οι τιμές της μυκηλιακής ανάπτυξης που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα εντός της ίδιας στήλης δεν διαφέρουν στατιστικώς σύμφωνα με το κριτήριο LSD ($p \leq 0.05$)

A. alternata : Το αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp *macrophylla* επηρεάζει τη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. alternata* (ANOVA $p=0.05$). Η ανάπτυξη του μυκηλίου αναστέλλεται σε συγκέντρωση μικρότερη των 10 μL /τρυβλίο.

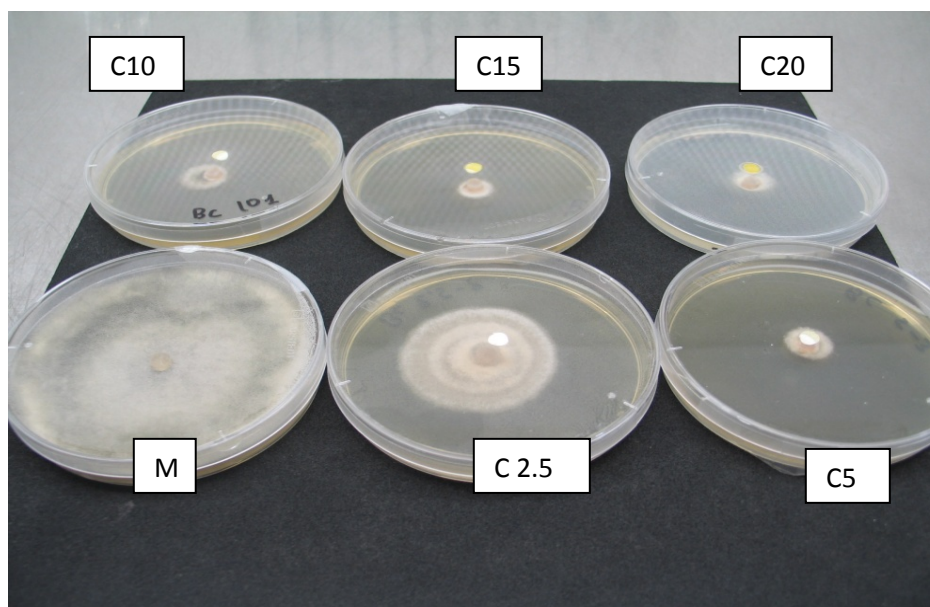
F. oxysporum f.sp. lycopersici: Η ανάπτυξη του μυκηλίου επηρεάζεται από την επίδραση των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου (ANOVA $p=0.05$). Η μυκηλιακή ανάπτυξη αναστέλλεται σε συγκέντρωση μικρότερη των 10 μL /τρυβλίο.

B. cinerea: Το αιθέριο έλαιο επηρεάζει την ανάπτυξη του μυκηλίου (ANOVA $p=0.05$) του *B. cinerea* . Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (20 μL /τρυβλίο) η μυκηλιακή ανάπτυξη περιορίζεται αλλά δεν αναστέλλεται.

Η μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea* εκπεφρασμένη επί τοις 100 του μάρτυρα αναφέρεται σε γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 15) και σε εικόνα (Εικόνα 70) παρατηρείται η μυκηλιακή ανάπτυξη εμβολίων του *B. cinerea* την 6^η μέρα μετά την επέμβαση. Την 6^η μέρα ο μάρτυρας είχε καλύψει πλήρως όλο το τρυβλίο.



Γράφημα 15: Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **M.**: Μάρτυρας, **C2.5:** 2.5 μL / τρυβλίο, **C5:** 5 μL / τρυβλίο, **C10:** 10 μL / τρυβλίο, **C15:** 15 μL / τρυβλίο, **C20:** 20 μL / τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες.



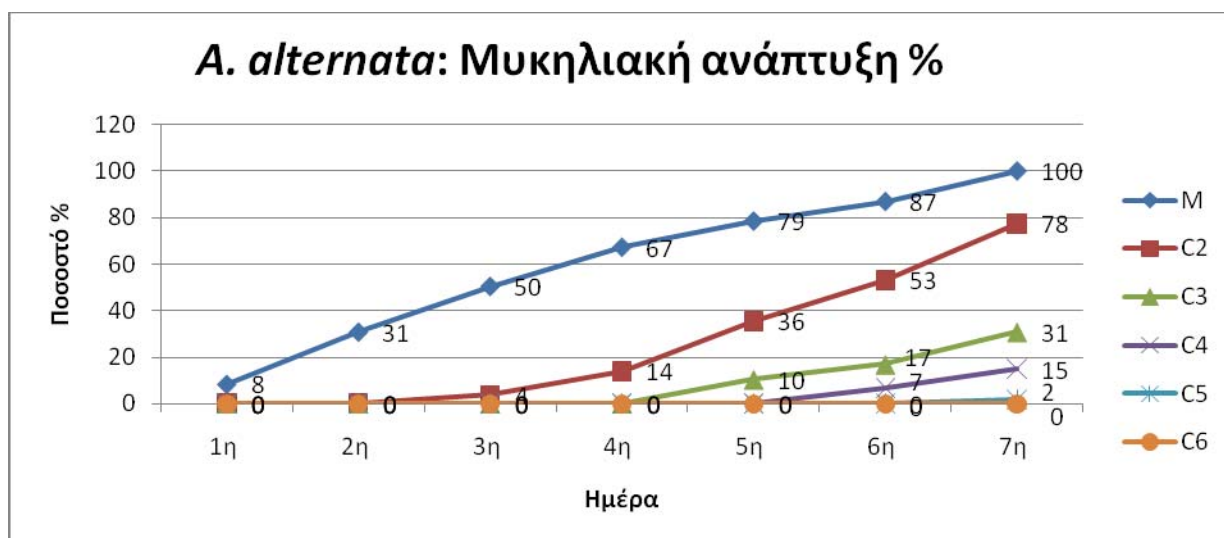
Εικόνα 70: Αντιμυκητική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στο μύκητα *B. cinerea* έπειτα από επώαση στους 26 °C για 6 μέρες. **M:** μάρτυρας, **C2.5:** 2.5 μL / τρυβλίο, **C5:** 5 μL / τρυβλίο, **C10:** 10 μL / τρυβλίο, **C15:** 15 μL / τρυβλίο, **C20:** 20 μL / τρυβλίο

3.3.2.2.2 2ο Πείραμα: 0-2-3-4-5-6 μL /τρυβλίο

Στα παρακάτω γραφήματα αναφέρονται τα αποτελέσματα της μυκηλιακή ανάπτυξη των *A. alternata* (Γράφημα 16) και *F. oxysporum lycopersici* (Γράφημα 17), (εκπεφρασμένη επί τοις % του

αντίστοιχου μάρτυρα), παρουσία μικρότερων συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* συγκριτικά με το 1^ο πείραμα. Στο μέγιστο της ανάπτυξης του μάρτυρα αποδόθηκε η τιμή 100. Σε Εικόνες που ακολουθούν (**Εικόνα 71-72**) απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των εμβολίων την 7^η μέρα μετά την επέμβαση για όλες τις συγκεντρώσεις και τα δύο στελέχη μυκήτων.

3.3.2.2.1 *A. alternata*



Γράφημα 16: Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *A. alternata*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **C2:** 2μL/ τρυβλίο, **C3:** 3μL/ τρυβλίο, **C4:** 4μL/ τρυβλίο, **C5:** 5μL/ τρυβλίο, **C6:** 6μL/ τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα (ANOVA $p=0.00$) (LSD $p=0.00$)

Συγκέντρωση 2 μL/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 78% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

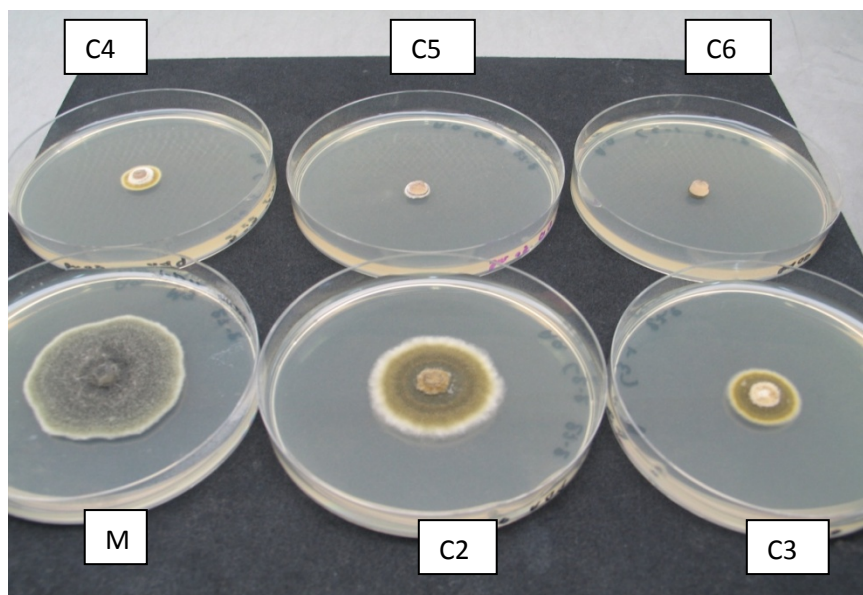
Συγκέντρωση 3 μL/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 31% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 4 μL/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 15 % της ανάπτυξης του μάρτυρα

Συγκέντρωση 5 μL/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 2 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

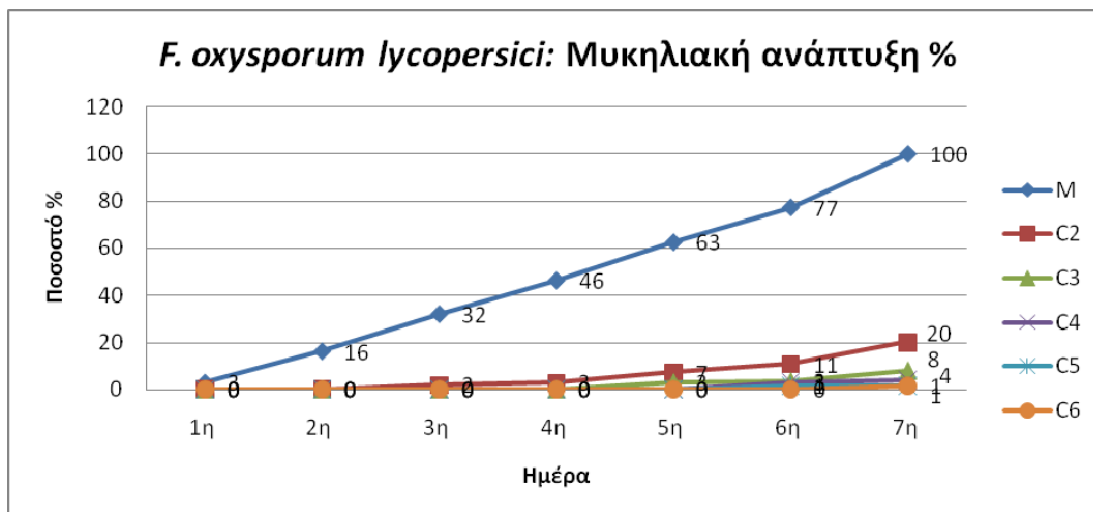
Συγκέντρωση 6 μL/ τρυβλίο: Η ανάπτυξη του μυκηλίου αναστάλθηκε πλήρως. Δύο μέρες μετά τη μεταφορά των εμβολίων σε καθαρό υπόστρωμα το μυκήλιο αναπτύχθηκε. Το αιθέριο έλαιο

παρουσίασε μυκοστατική δράση. Η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου (MIC) υπολογίστηκε σε 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ αέρα



Εικόνα 71: Αντιμυκητική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στον μύκητα *A. alternata* έπειτα από επώαση στους 26 °C για 7 μέρες. M: μάρτυρας, C2: 2 μL / τρυβλίο, C3: 3 μL / τρυβλίο, C4: 4 μL / τρυβλίο, C5: 5 μL / τρυβλίο, C6: 6 μL / τρυβλίο

3.3.2.2.2 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*



Γράφημα 17: Μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *F. oxysporum lycopersici*, παρουσία αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. C2: 2 μL / τρυβλίο, C3: 3 μL / τρυβλίο, C4: 4 μL / τρυβλίο, C5: 5 μL / τρυβλίο, C6: 6 μL / τρυβλίο. Επώαση 26 °C για 7 μέρες.

Σε όλες τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το μάρτυρα (anova $p=0.00$) (LSD $p=0.00$)

Συγκέντρωση 2 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 20% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 3 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 8% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 4 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 4% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

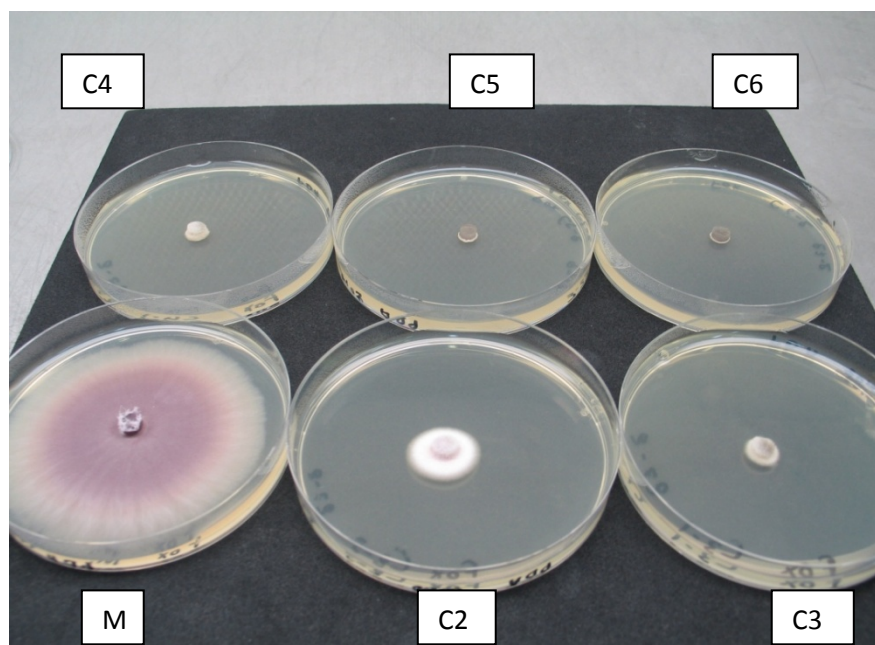
Συγκέντρωση 5 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 1% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Η ανάπτυξη του μυκηλίου σε δύο από τα τρία

Συγκέντρωση 6 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 1% της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Η ανάπτυξη του μυκηλίου σε 2 από τα τρία τρυβλία ήταν ορατή αλλά μη μετρήσιμη.

Συγκέντρωση 7 μL / τρυβλίο: Η ανάπτυξη του μυκηλίου αναστάλθηκε πλήρως. Μία μέρα μετά τη μεταφορά των εμβολίων σε καθαρό υπόστρωμα το μυκήλιο αναπτύχθηκε. Το αιθέριο έλαιο παρουσίασε μυκοστατική δράση. Η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της ανάπτυξης του μυκηλίου (MIC) υπολογίστηκε σε $123 \mu\text{L L}^{-1}$ αέρα



Εικόνα 72: Αντιμυκωτική δράση πτητικών ενώσεων αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στον μύκητα *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* έπειτα από επώαση στους 26°C για 7 μέρες. M: μάρτυρας, C2: 2 μL / τρυβλίο, C3: 3 μL / τρυβλίο, C4: 4 μL / τρυβλίο, C5: 5 μL / τρυβλίο, C6: 6 μL / τρυβλίο

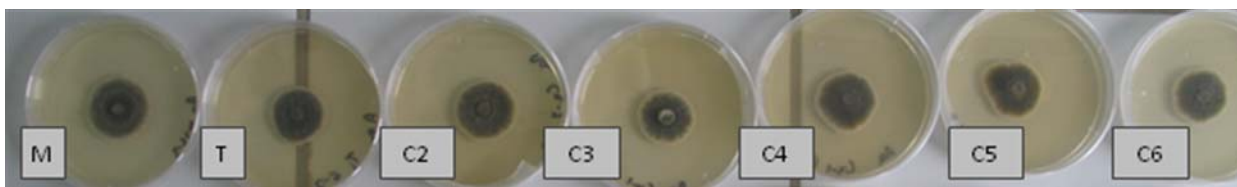
3.3.2.3 Αποτελέσματα μεθόδου ενσωμάτωσης σε στερεό μέσο

3.3.2.3.1 *A. alternata*

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 11) αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του αιθέριου ελαίου στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. alternata*, έπειτα από ενσωμάτωση στο θρεπτικό

υλικό. Στο μέγιστο της ανάπτυξης του μάρτυρα (T) περιεκτικότητας 2,2 % σε Tween 80 αποδόθηκε η τιμή 100. Στην εικόνα (**Εικόνα 73**) απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των εμβολίων την 5^η μέρα από την έναρξη του πειράματος.

Πίνακας 11: Μυκηλιακή ανάπτυξη του <i>A. alternata</i> έπειτα από εμβολισμό σε υποστρώμα εμβολισμένο με αιθέριο έλαιο 0-2-3-4-5-6 μl / τρυβλίο εκπεφρασμένη επί τοις 100 του μάρτυρα							
	1η μέρα	2η μέρα	3η μέρα	4η μέρα	5η μέρα	6η μέρα	7η μέρα
M	8.0 a	35 a	58 a	73 a	88 a	102 a	112 a
T	5.4 b	31 b	47 b,c,d	65 b	77 a,b	77 a,b	100 a,b
C2	5.4 b	27 c,d	49 b	62 b,c	78 a,b	78 a,b	101 a,b
C3	5.4 b	24 c,d	48 b,c	62 b,c	76 a,b	76 a,b	97 a,b
C4	1.8 c	21 d,e	43 c,d	58 b,c	74 b	74 a,b	102 a,b
C5	0.9 c	19 e,f	42 d	56 c	75 b	75 a,b	99 a,b
C6	0.9 c	17 f	33 e	48 d	66 b	66 b	97 b
Για κάθε στήλη οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικός σημαντικά μεταξύ τους, Duncan p≤0.05.							



Εικόνα 73: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. alternata* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla* την 5^η μέρα. M: 0 μl/ τρυβλίο αιθέριο έλαιο και Tween 80, T: 2,2 % σε Tween 80, C2-C6: συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μl/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2,2% σε Tween 80 .

Tween 80: Το Tween 80 συγκέντρωσης 2,2 % στο θρεπτικό υλικό επηρέασε αρνητικά την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *A. alternata*. Τις 4 πρώτες μέρες του πειράματος η διαφορά που σημειώθηκε ήταν στατιστικώς σημαντική.

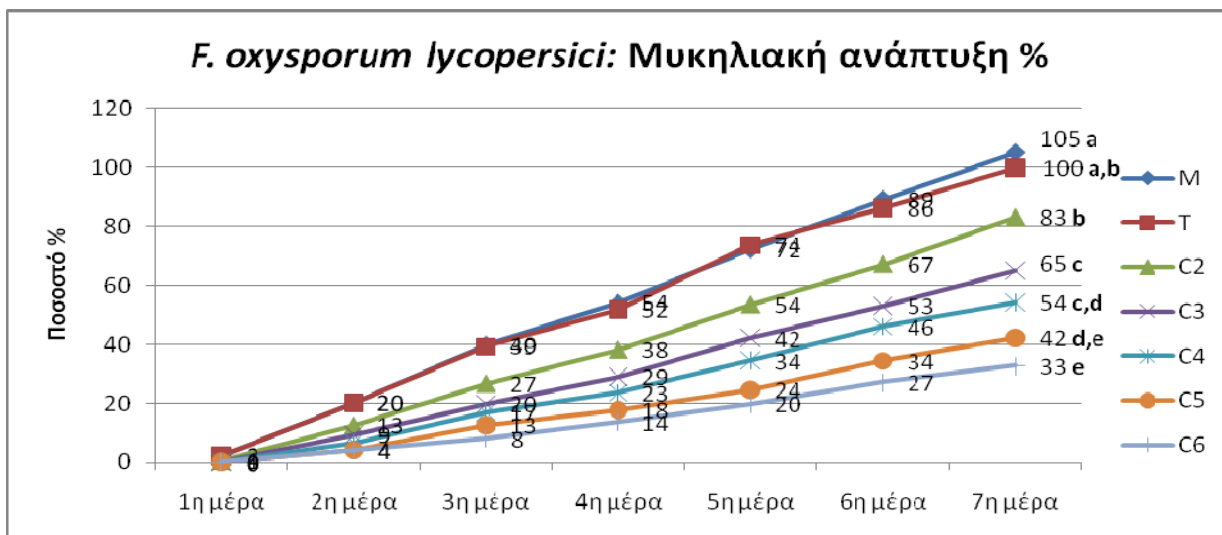
Συγκέντρωση 2 και 3 μl/ τρυβλίο: Μόνο τη 2^η μέρα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μάρτυρα Tween 80 συγκέντρωσης 2,2 %.

Συγκέντρωση 4 μl/ τρυβλίο: Μόνο τις 2 πρώτες μέρες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά αναφορικά με την ανάπτυξη του μυκηλίου του *A. alternata* συγκριτικά με το μάρτυρα που δέχθηκε την επίδραση του Tween 80 (2,2 %).

Συγκέντρωση 5 και 6 μL / τρυβλίο: Τις 4 πρώτες μέρες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά αναφορικά με τη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα. Η διαφορά αυτή από την 5^η μέρα ήταν στατιστικώς μη σημαντική συγκριτικά με το μάρτυρα που δέχθηκε την επίδραση του Tween 80.

3.3.2.3.2 *F. oxysporum lycopersici*

Στον επόμενο γράφημα (Γράφημα 18) αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του αιθέριου ελαίου στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, έπειτα από ενσωμάτωση στο θρεπτικό υλικό. Στο μέγιστο της ανάπτυξης του μάρτυρα (T) περιεκτικότητας 2,2 % σε Tween 80 αποδόθηκε η τιμή 100. Στην εικόνα (Εικόνα 74) απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των εμβολίων την 5^η μέρα από την έναρξη του πειράματος.



Γράφημα 18: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **M:** 0 μL / τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, **T:** 2,2 % σε Tween 80, **C2-C6:** συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL / τρυβλίο και περιεκτικότητα 2,2% σε Tween 80. Οι μέσοι όροι (7η μέρα) που συνοδεύονται από τον ίδιο αριθμό δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Duncan $p \leq 0.05$).

Tween 80 συγκέντρωσης 2,2 %: Δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum lycopersici*.

Αιθέριο έλαιο: Επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την ανάπτυξη μυκηλίου του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Anova $p=0.000$).

Συγκέντρωση 2 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα του πειράματος δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη μυκηλίου του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* συγκριτικά με το μάρτυρα

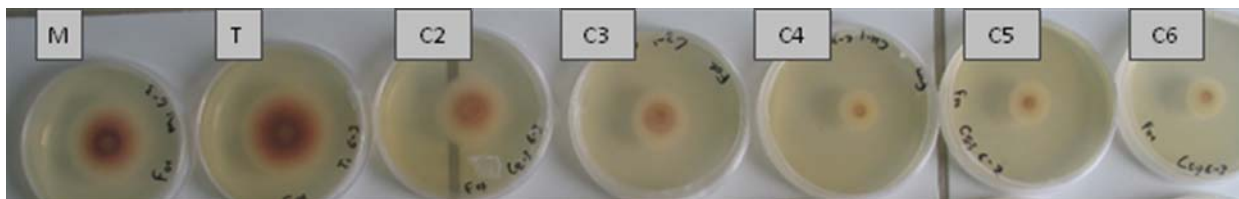
(Tween 80 2,2 %) (Duncan $p = 0.057$). Το μυκήλιο παρουσίασε το 83 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 3 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 65 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 4 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 54 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 5 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 42 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

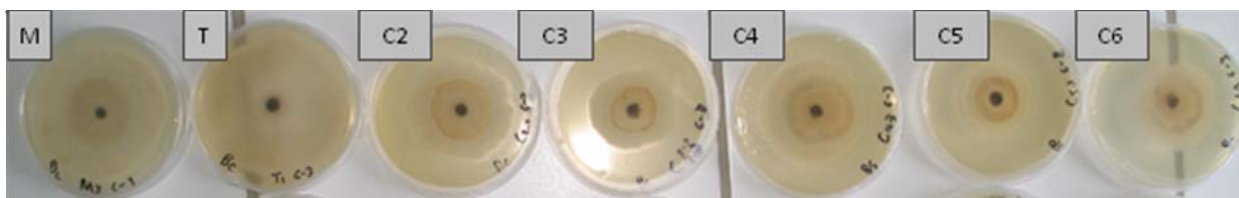
Συγκέντρωση 6 μL / τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 33 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.



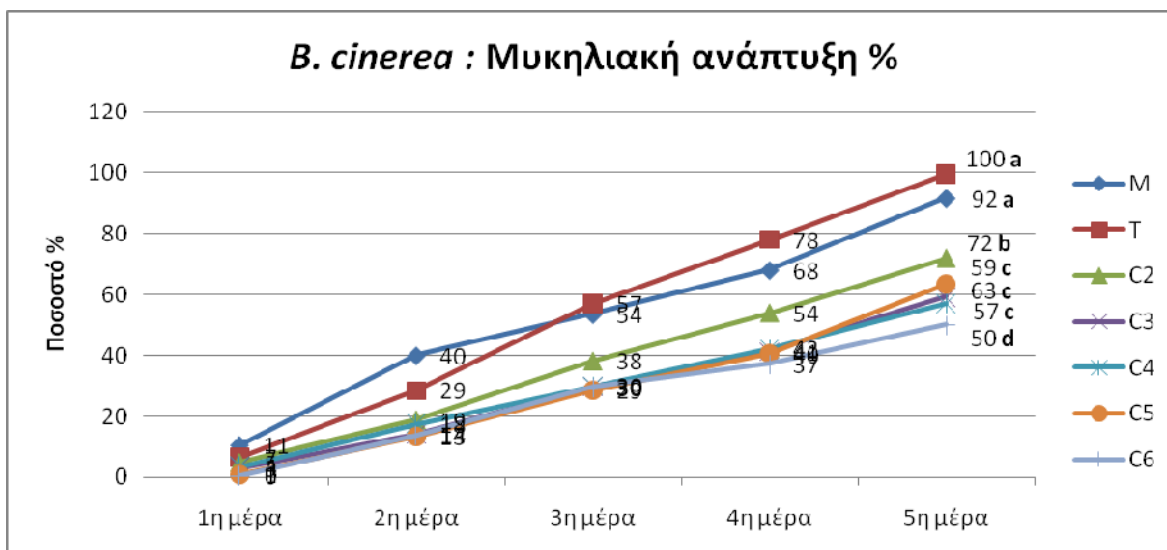
Εικόνα 74: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum f. sp. lycopersici* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2,2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **M:** 0 μL / τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, **T:** 2.2 % σε Tween 80, **C2-C6:** συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL / τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80.

3.3.2.3.3 *Botrytis cinerea*

Το γράφημα που ακολουθεί (**Γράφημα 19**) αφορά την επίδραση αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla* στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea*, έπειτα από ενσωμάτωση στο θρεπτικό υλικό. Στο μέγιστο της ανάπτυξης του μάρτυρα (T) περιεκτικότητας 2.2 % σε Tween 80 αποδόθηκε η τιμή 100. Στην εικόνα (**Εικόνα 75**) απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των εμβολίων την 5^η μέρα από την έναρξη του πειράματος.



Εικόνα 75: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2.2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **M:** 0 μL / τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, **T:** 2.2 % σε Tween 80, **C2-C6:** συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μL / τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80.



Γράφημα 19: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea* σε υπόστρωμα (PDA) περιεκτικότητας 2.2% σε Tween 80 στο οποίο έχει ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla*. **M:** 0 μ L/ τρυβλίο Αιθέριο έλαιο και Tween 80, **T:** 2.2 % σε Tween 80, **C2-C6:** συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 2 -6 μ L/ τρυβλίο και περιεκτικότητα 2.2% σε Tween 80. Οι μέσοι όροι (7η μέρα) που συνοδεύονται από τον ίδιο αριθμό δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Duncan $p \leq 0.05$).

Το Tween 80 συγκέντρωσης 2,2 %: Δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την μυκηλιακή ανάπτυξη του *B. cinerea*.

Αιθέριο έλαιο: Επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την ανάπτυξη μυκηλίου του *B. cinerea* (Anova $p=0.000$).

Συγκέντρωση 2 μ L/ τρυβλίο: Παρουσίασε στατιστικώς σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα από την 3^η μέρα του πειράματος και μετά. Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 72 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 3 μ L/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 59 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 4 μ L/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 63 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

Συγκέντρωση 5 μ L/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 57 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

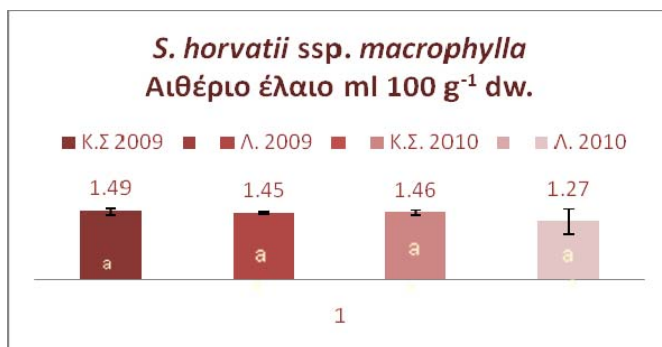
Συγκέντρωση 6 μ L/ τρυβλίο: Την 7^η μέρα το μυκήλιο παρουσίασε το 50 % της ανάπτυξης του μάρτυρα.

3.4 Αποτελέσματα Αναλύσεων

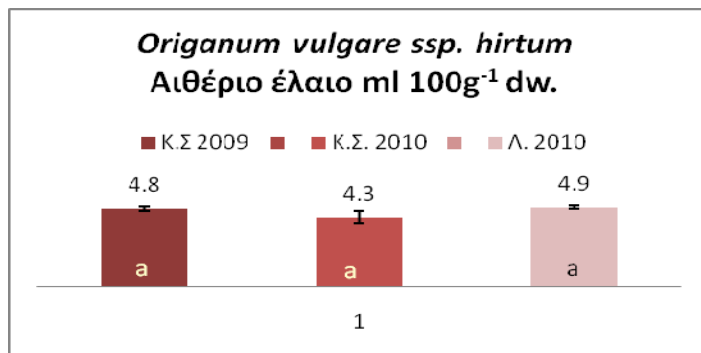
3.4.1 Περιεκτικότητα των *S. horvatii* ssp. *macrophylla* & *O. vulgare* ssp. *hirtum* σε αιθέριο έλαιο

Στα παρακάτω γραφήματα αναφέρονται τα αποτελέσματα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο των αρωματικών φυτών *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (Γράφημα 20) και *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Γράφημα 21). Το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε από φυτικό υλικό που συλλέχθηκε στα τέλη Αυγούστου του 2009, 2010 και για την αποξήρανσή του χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος της λυοφιλοποίησης και η μέθοδος της αποξήρανσης σε κανονικές συνθήκες.

Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο των *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (one way ANOVA, $p=0,44$) και *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Ανοva, $p=0,10$) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά για τα δύο έτη δειγματοληψίας και τις δύο μεθόδους αποξήρανσης



Γράφημα 20: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της περιεκτικότητας του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* σε αιθέριο έλαιο. Έτη συλλογής: 2009,2010. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό, Κ.Σ.: Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P<0.05$).



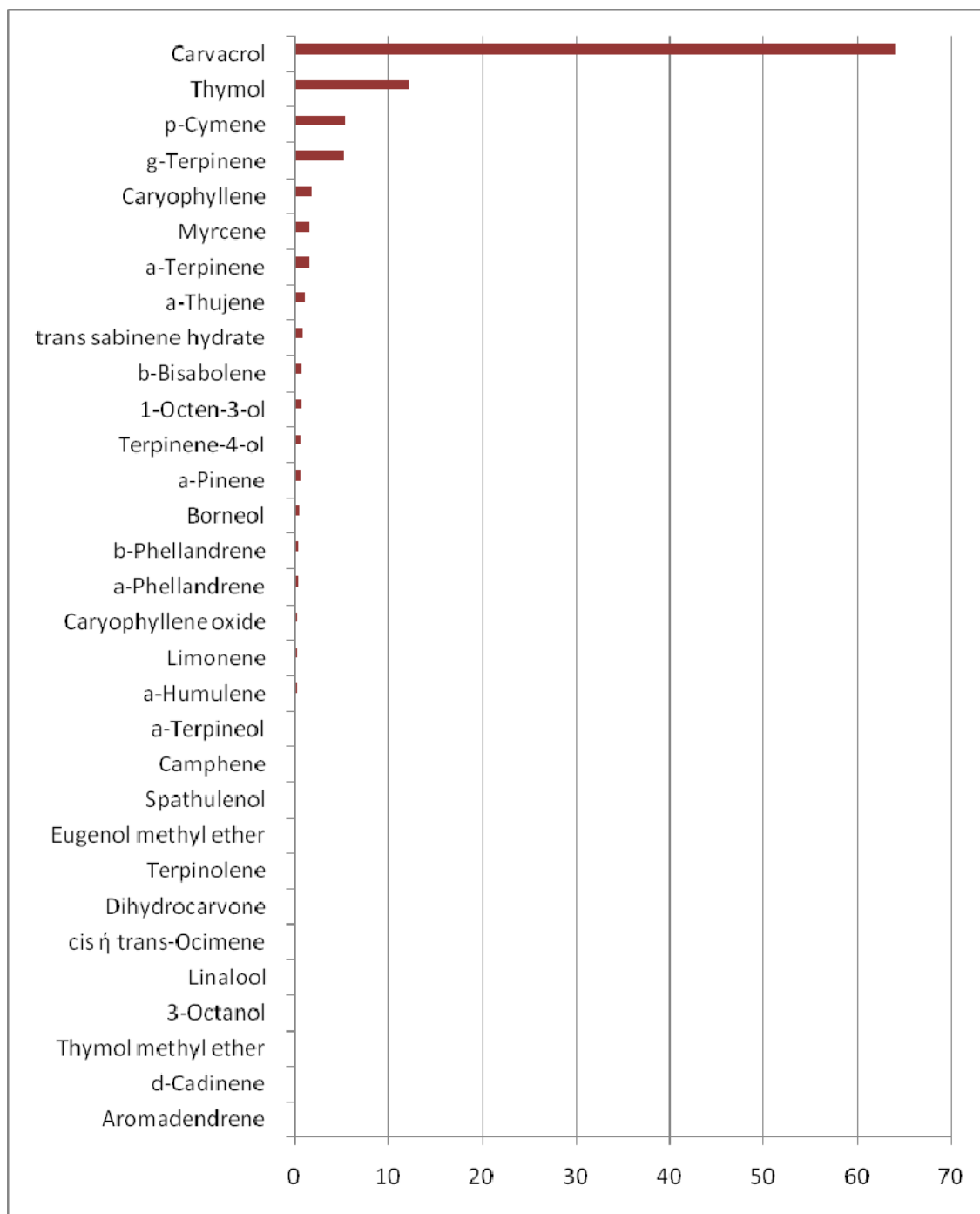
Γράφημα 21: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της περιεκτικότητας του *Origanum vulgare* ssp *hirtum* σε αιθέριο έλαιο. 2009,2010: Έτη συλλογής. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό, Κ.Σ.: Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό. Οι μέσοι όροι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P<0.05$).

3.4.2 Αποτελέσματα GC-MS ανάλυσης

3.4.2.1 Αιθέριο έλαιο *O. vulgare* spp *hirtum*

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακα 12) αναφέρονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του αιθέριου ελαίου του *O. vulgare* spp *hirtum* και στο γράφημα (Γράφημα 22) ταξινομήθηκαν τα ταυτοποιημένα συστατικά σύμφωνα με τη συνεισφορά τους. Το αντίστοιχο χρωματογράφημα επισυνάπτεται στο παράρτημα (Παράρτημα).

Πίνακας 12: Συστατικά αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού <i>O. vulgare</i> spp <i>hirtum</i>				
A/A	R.T. (min)	R.I.	Συστατικά	Ποσοστό %
1	6.10	928	α-Thujene	1.19
2	6.35	937	α-Pinene	0.62
3	6.88	955	Camphene	0.14
4	7.76	986	1-Octen-3-ol	0.71
5	7.98	993	Myrcene	1.68
6	8.31	1004	3-Octanol	0.04
7	8.67	1013	α-Phellandrene	0.42
8	9.04	1023	α-Terpinene	1.63
9	9.39	1032	p-Cymene	5.4
10	9.50	1035	Limonene	0.3
11	9.60	1038	b-Phellandrene	0.42
12	10.05	1050	cis Ocimene	0.06
13	10.61	1065	g-Terpinene	5.27
14	11.14	1079	trans sabinene hydrate	0.94
15	11.66	1093	Terpinolene	0.08
16	12.25	1107	Linalool	0.05
17	15.54	1185	Borneol	0.55
18	15.85	1192	Terpinene-4-ol	0.62
19	16.54	1207	α-Terpineol	0.17
20	16.74	1211	Dihydrocarvone	0.07
21	18.39	1242	Thymol methyl ether	0.02
22	21.91	1305	Thymol	12.17
23	22.79	1316	Carvacrol	63.99
24	30.93	1417	Eugenol methyl ether	0.08
25	31.39	1424	Caryophyllene	1.92
26	32.72	1444	Aromadendrene	0.01
27	33.86	1461	α-Humulene	0.25
28	37.09	1514	b-Bisabolene	0.8
29	37.67	1526	d-Cadinene	0.01
30	40.64	1591	Spathulenol	0.1
31	40.76	1594	Caryophyllene oxide	0.3
Monoterpene Hydrocarbons				17.21
Oxygenated monoterpenes				78.56
Sesquiterpene hydrocarbons				2.99
Oxygenated sesquiterpenes				0.4
Others				0.85
Monoterpenes				95.77
Sesquiterpenes				3.39
RT: Χρόνος κατακράτησης				
RI: Retention Index relative to n-alkanes on BP-5 capillary column				



Γράφημα 22: Ταξινόμηση των ταυτοποιημένων συστατικών αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *O. vulgare* spp *hirtum*

Ταυτοποιήθηκαν 31 συστατικά, τα οποία αποτελούν 98,57% των συστατικών του αιθέριου ελαίου.

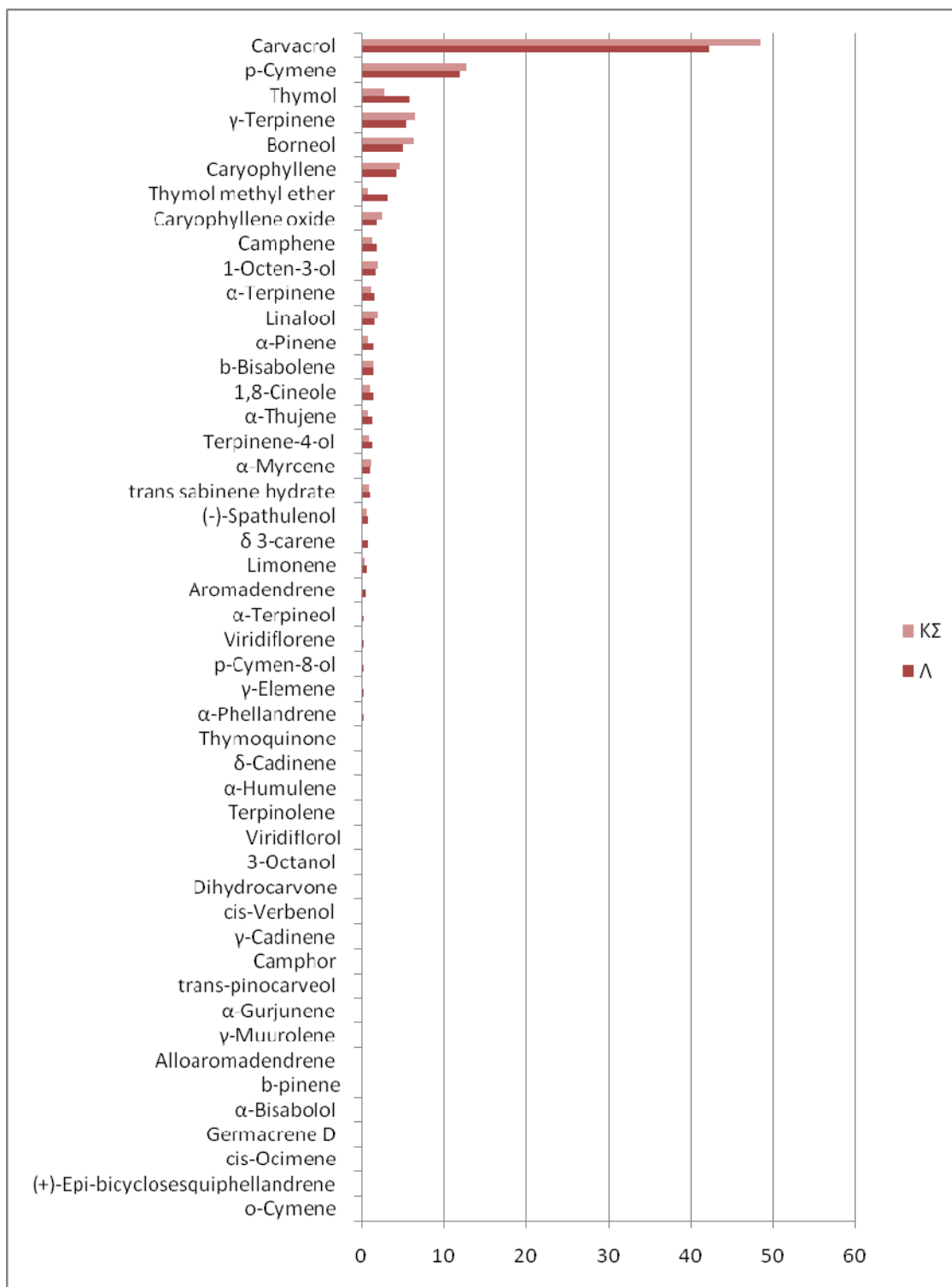
3.4.2.2 Ποιοτική σύσταση αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* spp. *macrophylla*

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) αναφέρεται η μέση τιμή και το εύρος διακύμανσης της % αναλογίας για κάθε ταυτοποιημένο συστατικό, ενώ το γράφημα (Γράφημα 24) αναφέρεται σε ένα χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου. Όλα τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων επισυνάπτονται στο παράρτημα (Παράρτημα).

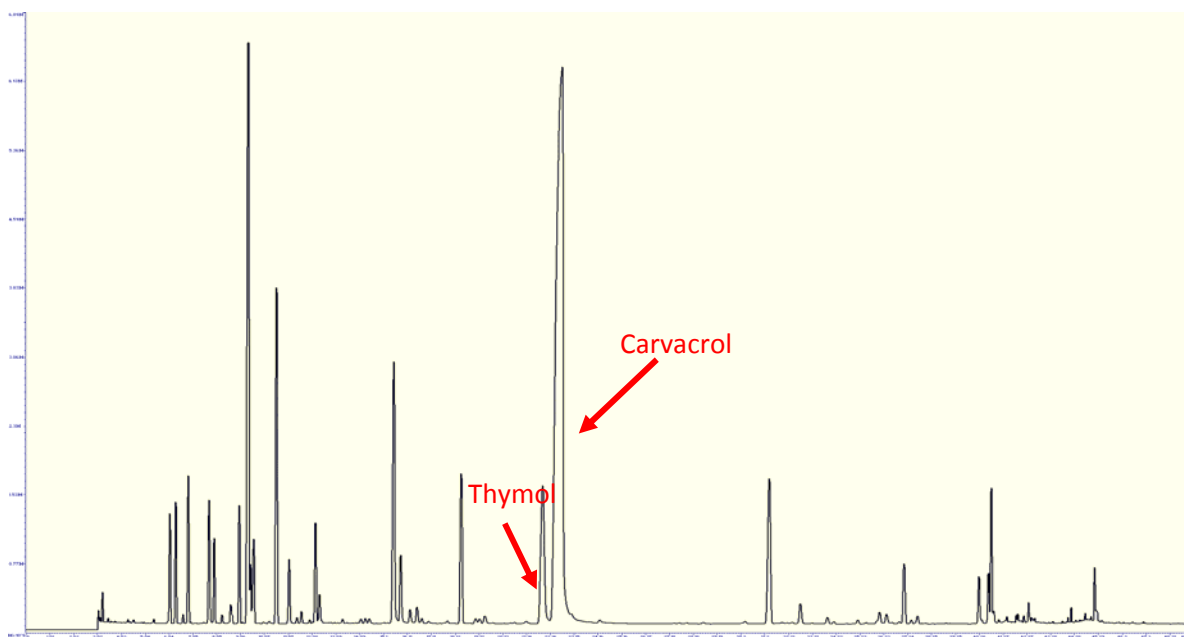
Στο αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε από το λυοφιλοποιημένο και αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό ταυτοποιήθηκαν 43 και 48 συστατικά αντίστοιχα. Τα ταυτοποιημένα συστατικά αποτελούν το 95-97% των συστατικών του αιθέριου ελαίου, τα οποία ταξινομήθηκαν ανάλογα με την ποιοτική τους σύσταση σε αυτό (Γράφημα 23).

Πίνακας 13: Ποιοτική σύσταση αιθέριου ελαίου αρωματικού φυτού <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> από λυοφιλοποιημένο (Λ) και αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες (Κ.Σ.) φυτικό υλικό. Αναφέρονται η μέση τιμή και (σε παρένθεση) ελάχιστη-μέγιστη τιμή (%) των ταυτοποιημένων συστατικών					
α/α	RT (min)	RI	Συστατικά	Κ.Σ	Λ
1	6.10	928	α-Thujene	1.29 (1.26-1.31)	0.80 (0.72-0.88)
2	6.35	937	α-Pinene	1.41 (1.39-1.43)	0.83 (0.74-0.92)
3	6.88	955	Camphene	1.80 (1.73-1.86)	1.34 (1.18-1.49)
4	7.52	977	Sabinene	0.05 (tr-0.1)	nd
5	7.76	986	1-Octen-3-ol	1.71 (1.67-1.75)	1.89 (1.65-2.13)
6	7.98	993	α-Myrcene	1.06 (1.05-1.06)	1.11 (0.90-1.31)
7	8.31	1004	3-Octanol	0.12 (0.10-0.14)	0.09 (0.07-0.10)
8	8.67	1013	α-Phellandrene	0.23 (0.22-0.24)	0.08 (0.06-0.10)
9	8.70	1014	δ 3-carene	0.04(0.08- 0.00)	nd
10	9.03	1023	α-Terpinene	1.6 (1.57-1.62)	1.19 (1.07-1.3)
11	9.15	1026	o-Cymene	0.01 (0.01-0.01)	0.01 (tr-0.01)
12	9.40	1033	p-Cymene	11.91 (11.09-12.72)	12.68 (11.11-14.24)
13	9.50	1035	Limonene	0.64 (0.62-0.65)	0.37 (0.37-0.38)
14	9.64	1039	1,8-Cineole	1.36 (1.35-1.36)	0.99 (0.95-1.02)
15	10.03	1049	cis-Ocimene	0.03 (0.02-0.04)	0.02 (tr-0.04)
16	10.60	1065	γ-Terpinene	5.39 (5.35-5.43)	6.44 (5.85-7.03)
17	11.14	1080	trans sabinene hydrate	1.01 (0.97-1.04)	0.92 (0.88-0.96)
18	11.66	1093	Terpinolene	0.17 (0.16-0.18)	0.07 (0.06-0.07)
19	12.25	1107	Linalool	1.55 (1.54-1.55)	1.88 (1.75-2.01)
20	14.17	1153	trans-pinocarveol	0.08 (0.07-0.09)	0.02 (0.01-0.03)
21	14.35	1157	cis-Verbenol	0.10 (0.08-0.11)	0.08 (0.06-0.09)

22	14.52	1161	Camphor	0.08 (0.07-0.08)	0.06 (0.04-0.07)
23	15.55	1185	Borneol	5.09 (4.96-5.22)	6.31 (5.64-6.97)
24	15.84	1192	Terpinene-4-ol	1.23 (1.17-1.29)	0.96 (0.87-1.04)
25	16.24	1201	p-Cymen-8-ol	0.25 (0.23-0.27)	0.19 (0.18-0.19)
26	16.52	1207	α -Terpineol	0.32 (0.27-0.36)	0.18 (0.16-0.20)
27	16.73	1211	Dihydrocarvone	0.10 (0.08-0.11)	0.03 (0.01-0.04)
28	18.40	1242	Thymol methyl ether	3.1 (3.05-3.14)	0.72 (0.67-0.76)
29	19.39	1261	Thymoquinone	0.19 (0.15-0.22)	0.09 (0.01-0.17)
30	21.80	1304	Thymol	5.8 (5.48-6.12)	2.67 (2.33-3)
31	22.59	1313	Carvacrol	42.3 (40.70-43.81)	48.45 (46.85-50.04)
32	30.37	1408	α -Gurjunene	0.07 (0.05-0.08)	nd
33	31.40	1424	Caryophyllene	4.30 (4.21-4.38)	4.68 (4.53-4.82)
34	32.72	1444	Aromadendrene	0.52 (0.49-0.55)	0.14 (0.11-0.17)
35	33.86	1461	α -Humulene	0.17 (0.16-0.17)	0.03 (0.01-0.05)
36	34.11	1465	Alloaromadendrene	0.05 (0.03-0.07)	nd
37	35.15	1480	γ -Muurolene	0.05 (0.01-0.08)	0.01 (0.01-0.01)
38	35.49	1485	Germacrene D	0.03 (0.02-0.03)	0.02 (0.01-0.02)
39	36.06	1494	Viridiflorene	0.26 (0.23-0.29)	0.04 (0.01-0.07)
40	36.35	1498	γ -Elemene	0.24 (0.22-0.25)	0.17 (0.17-0.17)
41	37.09	1514	b-Bisabolene	1.37 (1.29-1.45)	1.40 (1.28-1.51)
42	37.39	1520	γ -Cadinene	0.09 (0.08-0.09)	0.02 (0.01-0.02)
43	37.66	1526	δ -Cadinene	0.17 (0.16-0.18)	0.03 (0.01-0.05)
44	40.64	1591	Spathulenol	0.83 (0.73-0.92)	0.59 (0.56-0.62)
45	40.76	1594	Caryophyllene oxide	1.83 (1.72-1.94)	2.44 (2.31-2.57)
46	40.87	1596	Viridiflorol	0.16 (0.15-0.17)	0.07 (0.05-0.08)
47	41.94	1662	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	0.01 (0.01-0.01)	nd
48	42.47	1699	α -Bisabolol	0.04 (0.03-0.04)	0.02 (0.01-0.02)
Monoterpene hydrocarbons				24.905 (24.55-25.26)	26.34 (24.86-27.82)
Oxygenated monoterpenes				62.785 (62.56-63.01)	59.38 (58.18-60.57)
Sesquiterpene hydrocarbons				6.585 (6.44-6.73)	7.46 (7.18-7.73)
Oxygenated sesquiterpenes				3.045 (2.89-3.2)	2.69 (2.48-2.9)
Others				2.69 (2.39-2.99)	4.93 (4.90-4.95)
Monoterpenes				87.69 (87.11-88.27)	85.72 (85.43-86)
Sesquiterpenes				9.63 (9.33-9.93)	10.15 (9.66-10.63)
RT: Χρόνος κατακράτησης					
RI: Retention Index relative to n-alkanes on BP-5 capillary column					
tr: Ίχνη					
nd: Μη ανιχνεύσιμο					



Γράφημα 23: Ταξινόμηση των ταυτοποιημένων συστατικών αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. Λ.: Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό. Κ.Σ. Αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό.



Γράφημα 24: Χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*.

3.4.2.3 Ποιοτική σύσταση μεθανολικού εκχυλίσματος και εκχυλίσματος εφαρμογής

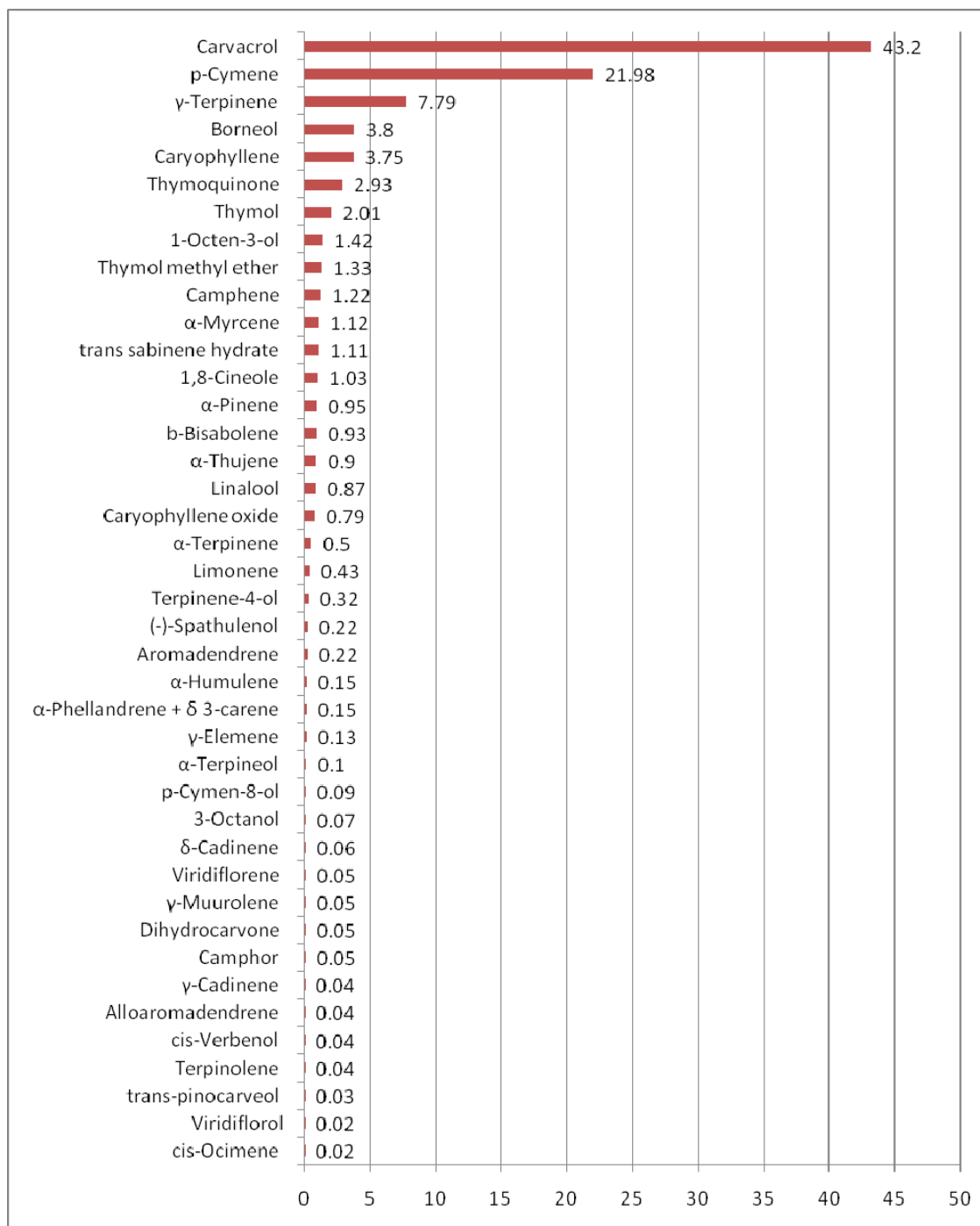
Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 14**) αναφέρονται τα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν με την αέριοχρωματογραφική ανάλυση (GC-MS) στο μεθανολικό εκχύλισμα του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*, καθώς και εκείνα που περιέχονται στο Υδατικό εκχύλισμα που εφαρμόστηκε στα κύτταρα.

Στο μεθανολικό εκχύλισμα που παραλήφθηκε από λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό ταυτοποιήθηκαν 42 συστατικά (**Πίνακας 15**), τα οποία αποτελούν το 96 % των συστατικών που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα. Τα περιεχόμενα συστατικά ταξινομήθηκαν ανάλογα με την ποιοτική τους σύσταση σε αυτό (**Γράφημα 25**). Στο εκχύλισμα που εφαρμόστηκε στα κύτταρα περιέχονται μόνο 12 από τα ταυτοποιημένα συστατικά του MeOH εκχυλίσματος. Για να εκτιμηθούν ποσοτικά τα συστατικά του MeOH εκχυλίσματος που παραμένουν στο διάλυμα εφαρμογής θεωρήθηκε ότι το εμβαδό των ταυτοποιημένων κορυφών του MeOH εκχυλίσματος αποτελούν το 100% των συστατικών. Στη συνέχεια το συνολικό εμβαδό των ταυτοποιημένων κορυφών του διαλύματος εφαρμογής εκφράστηκε ως ποσοστό των συστατικών του MeOH εκχυλίσματος.

Διαπιστώθηκε ότι τα ταυτοποιημένα συστατικά του διαλύματος εφαρμογής αντιπροσωπεύουν το 3.41 % των συστατικών του MeOH εκχύλισματος.

Πίνακας 14: Ποιοτική σύσταση των πτητικών ενώσεων που περιέχονται στο MeOH εκχύλισμα του <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> και του διαλύματος που εφαρμόστηκε στα A549 κύτταρα (Δ.Ε.).					
A/A	RT (min)	RI	Συστατικά	MeOH Εκχύλισμα (%)	Υδατικό διάλυμα εφαρμογής %
1	6.00	928	α-Thujene	0.9	
2	6.24	937	α-Pinene	0.95	
3	6.78	955	Camphene	1.22	
4	7.69	986	1-Octen-3-ol	1.42	0.75
5	7.90	993	α-Myrcene	1.12	
6	8.23	1004	3-Octanol	0.07	
7	8.59	1013 & 1014	α-Phellandrene + δ 3-carene	0.15	
8	8.95	1023	α-Terpinene	0.5	
9	9.29	1033	p-Cymene	21.98	0.88
10	9.40	1035	Limonene	0.43	
11	9.55	1039	1,8-Cineole	1.03	
12	9.95	1049	cis-Ocimene	0.02	
13	10.49	1065	γ-Terpinene	7.79	0.23
14	11.03	1080	trans sabinene hydrate	1.11	0.54
15	11.55	1093	Terpinolene	0.04	
16	12.14	1107	Linalool	0.87	0.55
17	14.04	1153	trans-pinocarveol	0.03	
18	14.23	1157	cis-Verbenol	0.04	
19	14.40	1161	Camphor	0.05	
20	15.40	1185	Borneol	3.8	4.87
21	15.71	1192	Terpinene-4-ol	0.32	0.6
22	16.11	1201	p-Cymen-8-ol	0.09	0.47
23	16.40	1207	α-Terpineol	0.1	0.45
24	16.60	1211	Dihydrocarvone	0.05	
25	18.24	1242	Thymol methyl ether	1.33	
26	19.21	1261	Thymoquinone	2.93	4.86
27	21.58	1304	Thymol	2.01	1.82
28	22.20	1313	Carvacrol	43.2	83.99
29	31.15	1424	Caryophyllene	3.75	
30	32.49	1444	Aromadendrene	0.22	
31	33.63	1461	α-Humulene	0.15	
32	33.91	1465	Alloaromadendrene	0.04	
33	35.27	1480	γ-Muurolene	0.05	
34	35.85	1494	Viridiflorene	0.05	
35	36.14	1498	γ-Elemene	0.13	
36	36.89	1514	b-Bisabolene	0.93	
37	37.18	1520	γ-Cadinene	0.04	
38	37.45	1526	δ-Cadinene	0.06	
39	40.52	1591	Spathulenol	0.22	
40	40.64	1594	Caryophyllene oxide	0.79	
41	40.76	1596	Viridiflorol	0.02	
Monoterpene hydrocarbons				35.1	1.11
Oxygenated monoterpenes				55.63	98.15
Sesquiterpene hydrocarbons				5.44	
Oxygenated sesquiterpenes				1.01	
Others				2.82	0.75
Monoterpenes				90.73	99.26

Sesquiterpenes	6.45	0.75
RT: Retention Time		
RI: Retention Index relative to n-alkanes on BP-5 capillary column		
tr: ίχνη		



Γράφημα 25: Ταξινόμηση ταυτοποιημένων συστατικών μεθανολικού εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*.

3.4.2.4 Συλλογή πτητικών συστατικών του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* με DHS και ανάλυσή τους με GC-MS.

Τα πτητικά συστατικά που συλλέχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν έπειτα από επώαση λυοφιλοποιημένου φυτικού υλικού σε θερμοκρασία 40 °C για 4 min αναφέρονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Ταυτοποιημένα πτητικά συστατικά λυοφιλοποιημένου φυτικού υλικού του αρωματικού φυτού <i>S. horvatii</i> ssp. <i>macrophylla</i> έπειτα από επώαση στους 40 °C (DHS-GC-MS)				
A/A	RT (min)	RI	Συστατικά	% Ξηρού φυτικού ιστού
1	6.31	928	α-Thujene	5.24
2	6.55	937	α-Pinene	5.25
3	7.07	955	Camphene	5.47
4	7.73	978	Sabinene	0.11
5	7.92	977	β-Pinene	1.19
6	8.16	993	α-Myrcene	7.26
7	8.87	1013	α-Phellandrene	1.19
8	9.21	1023	α-Terpinen	5.06
9	9.57	1033 ,1035	p-Cymene + Limonene	39.65
10	9.8	1039	1,8-Cineole	5.23
11	10.75	1065	γ-Terpinene	22.02
12	11.41	1080	trans- Sabinene hydrate	0.03
13	11.81	1093	Terpinolene	0.05
14	12.47	1107	Linalool	0.09
15	18.48	1242	Thymol methyl ether	2.17
Monoterpene Hydrocarbons				92.49
Oxygenated monoterpenes				5.35
Others				2.17
RT: χρόνος κατακράτησης				
RI: Retention Index relative to n-alkanes on BP-5 capillary column				

Κεφάλαιο 4^ο

Συζήτηση

Η έρευνα που αφορά τις βιολογικές δράσεις των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά βήματα τα οποία αφορούν τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση και αποξήρανση του φυτικού υλικού, την προετοιμασία και παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών, τη διερεύνηση των βιολογικών και φαρμακολογικών τους δράσεων με την επιλογή κατάλληλων βιοδοκιμών, τη χημική ανάλυση και τον εντοπισμό των βιοενεργών συστατικών τους.

4.1 Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών

Για τις ανάγκες των βιοδοκιμών τα βιοδραστικά συστατικά παραλήφθηκαν με την μέθοδο της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων από λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό. Όπως είναι γνωστό η επιλογή του διαλύτη, το μέγεθος των τεμαχιδίων του φυτικού υλικού, η συχνότητα των υπερήχων, η θερμοκρασία και η διάρκεια της εκχύλισης επηρεάζουν την απόδοσή της (Wang & Weller 2006) και συνεπώς τη βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος. Έπειτα από μία σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων τα οποία αφορούσαν τη δοκιμή διαλυτών διαφορετικής πολικότητας αποφασίστηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης η μεθανόλη. Η επιλογή αυτή βασίστηκε αφενός μεν στη βιοδραστικότητα της υδατικής φάσης του αποξηραμένου μεθανολικού εκχυλίσματος το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα (*S. horvatii* spp. *macrophylla*) για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης στα καρκινικά κύτταρα A549 (κυτταρομετρία ροής), αλλά και στο γεγονός ότι οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων παρουσίασαν μικρή τυπική απόκλιση (Γράφημα 1), καλή δηλαδή επαναληψιμότητα. Αν και σύμφωνα με έναν γενικό κανόνα ο ρυθμός της εκχύλισης αυξάνει αυξανόμενης της θερμοκρασίας για όλους τους διαλύτες και τις τεχνικές εκχύλισης, επιλέχθηκε η θερμοκρασία της εκχύλισης να μην υπερβεί τους 40 °C για να αποφευχθεί τυχόν απώλεια σε θερμοευαίσθητα και πτητικά συστατικά.

Για την παραλαβή αιθέριων ελαίων από αρωματικά φυτά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υδρο-απόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την παραλαβή και τη μελέτη της βιοδραστικότητας των πτητικών ενώσεων που παράγονται από τα αρωματικά φυτά, ενώ με τη μέθοδο της εκχύλισης παραλαμβάνονται τόσο πτητικά όσο και μη πτητικά συστατικά.

4.2 Έλεγχος πιθανής αντικαρκινικής δράσης επιλεγμένων MeOH εκχυλισμάτων

Το συνεχές και αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων οφείλεται στην εμφάνιση παρενεργειών και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα συνήθως χρησιμοποιούμενα φάρμακα. Η αναζήτηση φυτικής προέλευσης συστατικών με αντικαρκινικές ιδιότητες παρουσιάζει ενδιαφέρον, αφενός λόγω της μεγάλης ποικιλότητας των συστατικών που διαθέτουν (Harvey 2000) και αφετέρου λόγω της μικρής συνήθως τοξικότητάς τους (Gali-Muhtasib et al. 2006). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν συστατικά τα οποία αποτελούν μέρος της διατροφής ή χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για τον αρωματισμό ή τη βελτίωση της γεύσης τους. Τα συστατικά αυτά χαρακτηρίζονται ως GRAS (**G**enerally **R**ecognized **A**s **S**afe) από την αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων και θεωρούνται ασφαλή. Όπως είναι γνωστό ένας από τους θεραπευτικούς στόχους των αντικαρκινικών φαρμάκων είναι η επαγωγή της απόπτωσης της ενεργοποίησης δηλαδή του ενδογενούς, γενετικά προκαθορισμένου προγράμματος αυτοκαταστροφής των καρκινικών κυττάρων. Στα πλαίσια τη διατριβής ελέγχθηκε η ικανότητα των επιλεγμένων εκχυλισμάτων να επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων A549. Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων και η μορφή του κυτταρικού θανάτου (απόπτωση – νέκρωση) μελετήθηκε *in vitro* με βιοχημικά και μορφολογικά κριτήρια.

4.2.1 Κυτταρομετρία ροής

4.2.1.1 Πρώτη διερεύνηση (screening)

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα των επιλεγμένων εκχυλισμάτων (20 mg mL^{-1} θεραπευτικού υλικού), να επάγουν τον μηχανισμό της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549. Έπειτα από σήμανση με Annexin V-FITC, PI και μέτρηση με κυτταρομετρία ροής διαπιστώθηκε ότι τα είδη *O. vulgare* spp. *hirtum* (Ελληνική ρίγανη), *R. officinalis* (Δεντρολίβανο), *C. capitatus* (Ισπανική ρίγανη ή Θυμάρι), *T. polium* (Παναγιόχορτο), *S. horvatii* spp. *macrophylla* (Θρούμπι) της οικογένειας Lamiaceae επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των A549 κυττάρων. Αυτά τα πρώτα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πρόσφατες μελέτες που αναφέρουν ότι αυτοφυή είδη της οικογένειας Lamiaceae, που αυτοφύονται στην περιοχή της Μεσογείου, παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (de Sousa et al. 2004, Nematollahi-Mahani et al. 2007, Chinou et al. 2007, Badisa et al. 2005).

Το είδος *O. vulgare* spp. *hirtum* διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά A549. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές (Savini et al. 2009), έπειτα από επίδραση του αλκοολικού εκχυλίσματος στην Caco2

καρκινική κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται ως προς τη μορφή του κυτταρικού θανάτου. Ενώ το εκχύλισμα του *O. vulgare* spp. *hirtum* το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές προκαλεί κυρίως νέκρωση στα καρκινικά κύτταρα A549, το αλκοολικό εκχύλισμα αναφέρεται ότι επάγει την απόπτωση των Caco2 καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα τα οποία αφορούν την κυτταροτοξική δράση του *T. polium* (Menichini et al. 2009) στην καρκινική κυτταρική σειρά A549 (Nematollahi-Mahani et al. 2007), καθώς και του *R. officinalis*, για το οποίο έχει διαπιστωθεί κυτταροτοξική δράση του αιθέριου ελαίου σε επιλεγμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Wang et al. 2012). Παρόλο που σύμφωνα με ερευνητικά αποτελέσματα τα είδη *S. fruticosa* (Badisa et al. 2005) και *S. officinalis* (Xavier et al. 2009, Russo 2013) επάγουν την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές που εφαρμόστηκαν, δεν διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα της πρώτης διερεύνησης σημαντική επίδραση στα καρκινικά κύτταρα A549, κάτι που μπορεί να οφείλεται στη μέθοδο που εφαρμόστηκε για την παραλαβή των συστατικών, στη διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των εκχυλισμάτων, στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, στην καρκινική κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τις βιοδοκιμές και στον διαφορετικό ίσως χημειότυπο των αρωματικών φυτών.

Σε αυτή την πρώτη διερεύνηση δεν ολοκληρώθηκε η μέτρηση (κυτταρομετρία ροής) στο δείγμα των κυττάρων που δέχθηκαν την επίδραση εκχυλίσματος φύλλων του *H. cyclophyllus* (Σκάρφη). Το είδος *H. cyclophyllus* (Lindholm et al. 2002) και τα συγγενικά του είδη *H. orientalis*, και *H. purpurascens* (Konkimalla & Efferth 2008) έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές ιδιότητες, χωρίς ο τρόπος δράσης τους να είναι γνωστός.

Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης διερεύνησης τέσσερα αρωματικά φυτά και το εκχύλισμα φύλλων του *H. cyclophyllus* επιλέχθηκε για την περεταίρω μελέτη της αντικαρκινικής του δράσης σε δοσοεξαρτώμενα πειράματα.

4.2.1.2 Δοσοεξαρτώμενα πειράματα

4.2.1.2.1 Επίδραση επιλεγμένων εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών

Επειδή η μορφή του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από τη διάρκεια και την ένταση του υπό μελέτη ερεθίσματος διερευνήθηκε η επίδραση των *O. vulgare* spp. *hirtum*, *R. officinalis*, *T. polium*, *S. horvatii* spp. *macrophylla* σε δοσοεξαρτώμενα πειράματα. Και για τα τέσσερα φυτικά είδη διαπιστώθηκε, ότι σε μία συγκεκριμένη “χαρακτηριστική συγκέντρωση” για κάθε φυτικό είδος, παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου (Γραφήματα 7-10), που οφείλεται για

το είδος *O. vulgare* spp. *hirtum* κυρίως σε νέκρωση (Annexin V⁻, PI⁺), ενώ για τα είδη *R. officinalis*, *C. capitatus*, *T. polium*, *S. horvatii* spp. *macrophylla* κυρίως σε απόπτωση πρώιμη (Annexin V⁺, PI⁻) ή όψιμη (Annexin V⁺, PI⁺).

Για τα είδη *R. officinalis*, *T. polium*, *S. horvatii* spp. *macrophylla* διαπιστώθηκε κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση του ταπήτιου των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο 24 ώρες μετά την εφαρμογή των εκχυλισμάτων (Εικόνες 43-45) ότι, στη “χαρακτηριστική συγκέντρωση” για κάθε φυτικό είδος, τα κύτταρα ήταν περισσότερο διογκωμένα συγκριτικά με τα κύτταρα του μάρτυρα, αλλά και συγκριτικά με τα κύτταρα μεγαλύτερων συγκεντρώσεων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η διόγκωση των κυττάρων είναι χαρακτηριστικό της νέκρωσης και όχι της απόπτωσης. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα των μετρήσεων στις “χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις” δείχνουν θετική σήμανση με Annexin V- FITC (Annexin V⁺). Παρατηρείται δηλαδή μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό της απόπτωσης σε ένα πρώιμο στάδιό της. Στις μεταχειρίσεις με *T. polium* και *S. horvatii* spp. *macrophylla* το μεγαλύτερο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (στις χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις) σημαίνονται θετικά με PI, κάτι που μπορεί να σχετίζεται είτε με ένα όψιμο στάδιο της απόπτωσης είτε με νέκρωση των κυττάρων.

Κατά την προετοιμασία των κυττάρων για τη σήμανσή τους με Annexin V- FITC και PI διαπιστώθηκε ότι στις “χαρακτηριστικές συγκεντρώσεις” τα κύτταρα είχαν ιδιαίτερα κολλώδη υφή και δυσκολία στην επαναιώρησή τους. Το κολλώδες της υφής πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας κάποια διογκωμένα κύτταρα καταστράφηκαν (λύση στη συνέχεια της κυτταρικής τους μεμβράνης) ή σε έκκριση πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης αυτών των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο παρατηρήθηκαν λιγότερες μετρήσεις κυττάρων στη μονάδα του χρόνου (events min⁻¹) συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα κάτι το οποίο εκτός των προαναφερόμενων, μπορεί να οφείλεται στην ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας και το σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων.

Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της “χαρακτηριστικής” παρατηρήθηκαν μεν μορφολογικές αλλοιώσεις, αλλά όχι η χαρακτηριστική διόγκωση των κυττάρων. Το ίζημα των κυττάρων είχε λιγότερο κολλώδη υφή ή τα κύτταρα είχαν μικρότερη συνοχή μεταξύ τους (ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος). Το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου ήταν μικρότερο συγκριτικά με εκείνο της

“χαρακτηριστικής συγκέντρωσης” με εξαίρεση το *O. vulgare* spp. *hirtum*, το οποίο παρουσίασε κατ’ εξαίρεση το μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (20 mg mL⁻¹).

Για την περεταίρω κατανόηση των φαινομένων, τα οποία παρατηρούνται, επιλέχθηκε ως αντιπρόσωπος για τη συνέχεια των πειραμάτων το είδος *S. horvatii* spp. *macrophylla* για τους παρακάτω λόγους:

- Ο πρώτος λόγος σχετίζεται με το γεγονός ότι το είδος αυτό παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό συνολικής απόπτωσης (πρώιμης και όψιμης) και τις προαναφερόμενες μορφολογικές διαφοροποιήσεις.
- Ο δεύτερος λόγος αφορά την πληροφορία ότι το συγκεκριμένο φυτικό είδος, το οποίο αποτελεί μέλος της ομάδας του *Satureja montana* (Flora Europa), είναι ενδημικό φυτό της χώρας μας και η εξάπλωσή του περιορίζεται στις βορειοδυτικές περιοχές της (Dardioti et al. 2010). Οι βιολογικές δράσεις του ενδημικού αυτού είδους δεν έχουν, απ’ όσο είναι μέχρι σήμερα γνωστό, μελετηθεί.
- Ο τρίτος είναι ότι το αρωματικό αυτό φυτό χρησιμοποιείται στη μαγειρική για τον αρωματισμό κρεάτων και για το λόγο αυτό θεωρείται ότι διαθέτει χαμηλή τοξικότητα ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Το είδος *S. horvatii* spp. *macrophylla* είναι σημαντικό μελισσοτροφικό φυτό. Αναφορικά με τη χρήση του στην παραδοσιακή ιατρική είναι γνωστό ότι αφέψημα αποξηραμένου φυτικού υλικού, σε μίγμα με άλλα αρωματικά φυτά, χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για την αντιμετώπιση της βρογχίτιδας και πιθανό να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Φυτικά εκχυλίσματα ή αιθέρια έλαια φυτικών ειδών τα οποία ανήκουν στο είδος *Satureja* έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακή (Stočkibušić & Bezić 2004, Vagionas et al. 2007, Bezić et al. 2005, Gören et al. 2004, Lakušić et al. 2008), αντιμυκητική (Soković 2002), αντιιική (Dunkić et al. 2010), αντιοξειδωτική (Radonic & Milos 2003, Čavar et al. 2008, Fraternali et al. 2007, Eminagaoglu et al. 2007, Oke et al. 2009, Grosso et al. 2009), αντιφλεγμονώδη (Hajhashemi et al. 2002), αντιδιαρροϊκή (Skočibušić & Bezić 2003) και αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Cetojević-Simin et al. 2004).

4.2.1.2.2 Επίδραση αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών

Τα είδη των αρωματικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae, που διακρίθηκαν για την κυτταροτοξικότητά τους στα A549 κύτταρα, παράγουν σημαντικές ποσότητες αιθέριου ελαίου. Από τα είδη αυτά το *O. vulgare* spp. *hirtum* παρουσίασε το μεγαλύτερο και δοσο- εξαρτώμενο ποσοστό κυτταρικού θανάτου. Για να διευκρινισθεί αν η βιολογική δράση οφείλεται σε πτητικά συστατικά, το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger, μετρήθηκε ποσοτικά, υπολογίσθηκε η περιεκτικότητα της μεγαλύτερης συγκέντρωσης (20 mg ξηρού φυτικού ιστού mL⁻¹) σε αιθέριο έλαιο και το ήμισυ αυτής (0.5 mL mL⁻¹) δοκιμάσθηκε στα A549 κύτταρα. Με κυτταρομετρία ροής και μικροσκοπική παρατήρηση διαπιστώθηκε, ότι το αιθέριο έλαιο ήταν ιδιαίτερα κυτταροτοξικό και προκάλεσε λύση της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή παθητική νέκρωση. Από τις διαπιστώσεις αυτές συμπεραίνεται ότι το αιθέριο έλαιο και η υδατική φάση του αποξηραμένου μεθανολικού εκχυλίσματος επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων με διαφορετικό τρόπο.

Για τον έλεγχο τις κυτταροτοξικότητας των αιθέριων ελαίων που παράγουν τα είδη *S. horvatii* spp. *macrophylla*, *C. capitatus* και *S. officinalis*, στα A549 κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το 1/10 της συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε για το *O. vulgare* spp. *hirtum*. Παρόλο που δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντικό ποσοστό κυτταρικού θανάτου (Γράφημα 11) φαίνεται ότι το αιθέριο έλαιο προκαλεί νέκρωση (Γράφημα 13) και όχι απόπτωση (Γράφημα 14).

Μετά τις παραπάνω παρατηρήσεις δημιουργήθηκαν τα εξής ερωτήματα:

- Τα συστατικά του αιθέριου ελαίου παραλαμβάνονται στο μεθανολικό εκχύλισμα;
- Αν παραλαμβάνονται περιέχονται στην υδατική φάση του αποξηραμένου μεθανολικού εκχυλίσματος που εφαρμόζεται στα κύτταρα;

Για να απαντηθούν τα ερωτήματα που δημιουργήθηκαν πραγματοποιήθηκε ανάλυση του αιθέριου ελαίου του *S. horvatii* spp. *macrophylla*, του MeOH εκχυλίσματος και του εκχυλίσματος που εφαρμόσθηκε στα κύτταρα.

4.2.1.2.3 Επίδραση εκχυλίσματος φύλλων *H. cyclophyllus*

Το εκχύλισμα φύλλων του *H. cyclophyllus* διαπιστώθηκε, ότι είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό, ακόμα και σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (0.1 mg d.w. mL⁻¹ θεραπευτικού υλικού), σε αντίθεση με το εκχύλισμα της ρίζας το οποίο δεν παρουσίασε καμία επίδραση (20 mg d.w. mL⁻¹). Τα αποτελέσματα που αφορούν την κυτταροτοξικότητα του εκχυλίσματος είναι σύμφωνα με εκείνα των Lindholm et al.

(2002) οι οποίοι μελέτησαν, με *in vitro* πειράματα, την κυτταροτοξικότητα εκατό φυτικών εκχυλισμάτων και κλασμάτων τους σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και διαπίστωσαν ότι το εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* ήταν ένα από τα πλέον κυτταροτοξικά. Κατά την παρατήρηση του ταπήτιου των κυττάρων, 24 ώρες μετά την επίδραση των εκχυλισμάτων διαπιστώθηκε, ότι τα κύτταρα ήταν αποκολλημένα και είχαν αποκτήσει σφαιρικό σχήμα. Στα φυσιολογικά αποκολλημένα επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιείται ένα ιδιαίτερος τύπος απόπτωσης που ονομάζεται αποikis (Valentijn et al. 2004). Στα καρκινικά κύτταρα η έκφραση συγκεκριμένων ογκογονιδίων προσδίδει ανθεκτικότητα στο αποikis (Frisch and Screation 2001, Yong-Nyun Kim, 2011). Η ανθεκτικότητα στο αποikis αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη μεταστάσεων που αποτελούν την κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο (Yong-Nyun Kim, 2011). Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι ακόμα και στη μικρότερη συγκέντρωση δεν ολοκληρώθηκε η μέτρηση του δείγματος, κάτι που οδήγησε στη σκέψη είτε ότι σε σημαντικό πληθυσμό καρκινικών κυττάρων έχει ενεργοποιηθεί το ενδογενές πρόγραμμα αυτοκαταστροφής του κυττάρου και σχηματίσθηκαν αποπτωτικά σωμάτια, είτε ότι το εκχύλισμα ήταν ιδιαίτερα τοξικό και προκάλεσε παθητική νέκρωση, λύση δηλαδή της κυτταρικής μεμβράνης.

Το *H. cyclophyllus* απαντάται σε ορεινές, σκιαζόμενες, πετρώδεις περιοχές της χώρας μας και είναι γνωστό με την κοινή ονομασία Σκάρφη, Κάρπη, Καρπί κ.ά. (Καββαδάς 1934). Η χρήση του είναι γνωστή από αρχαιότατων χρόνων για την αντιμετώπιση της μανίας και μέχρι τα τέλη του 19^{ου} αιώνα χρησιμοποιούνταν σε ψυχιατρεία. Οι ρήτορες και οι πολιτικοί το χρησιμοποιούσαν για να βελτιώσουν τη μνήμη τους (Καβαδδός 1934). Σύμφωνα με μελέτη των Vokou et al. (1993) οι κάτοικοι της περιοχής του Ζαγορίου χρησιμοποιούσαν το συγκεκριμένο φυτό για την αντιμετώπιση αναπνευστικών ασθενειών, ως αμβλωτικό, για την αντιμετώπιση του πονόδοντου και το έδιναν σε ζώα με μειωμένη παραγωγή γάλακτος. Σύμφωνα με προσωπικές πληροφορίες στην περιοχή της Ηπείρου χρησιμοποιούσαν τη ρίζα του φυτού για να αντιμετωπίσουν ασθένειες των ζώων, αλλά και για να σκαρφίσουν, όπως χαρακτηριστικά έλεγαν, τα δόντια. Με τη διαδικασία του “σκαρφίσματος” τα χαλασμένα δόντια καταστρέφονταν, ενώ τα υγιή παρέμεναν ανέπαφα. Υπήρχε δηλαδή κάποια εκλεκτικότητα ως προς τη δράση του. Οι ισχυρές αλληλοχημικές ιδιότητες του φυτού ήταν επίσης γνωστές από την ικανότητά του να ξηραίνει τα δένδρα με την παρεμβολή ενός τμήματος της τοξικής του ρίζας κάτω από το φλοιό των δένδρων (Καββαδάς 1934). Το είδος *H. cyclophyllus* (Lindholm et al. 2002) και τα συγγενικά είδη *H. orientalis*, και *H. purpurascens* (Konkimalla & Efferth 2008) αναφέρεται ότι διαθέτουν ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές ιδιότητες χωρίς ο τρόπος δράσης τους να

είναι γνωστός. Σύμφωνα με τους Rosselli et al. (2009) εκχυλίσματα του γένους *Helleborus* παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες όπως καρδιοτονωτική, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, μυοχαλαρωτική και ρυθμιστική των αιμοφόρων αγγείων.

4.3 Περαιτέρω έλεγχος της αντικαρκινική δράση του φαρμακευτικού φυτού *H. cyclophyllus*

4.3.1 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot

Όπως είναι γνωστό οι πρωτεάσες κιστεΐνης, κασπάσες, οι οποίες παράγονται στα κύτταρα ως ανενεργά προένζυμα (Saraste & Pulkki 2000), ενεργοποιούνται πρωτεολυτικά κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας (Boldingh Debernard et al. 2011). Η ενεργοποιημένη κασπάση -3, η οποία είναι μία κασπάση εκτελεστής της απόπτωσης, διασπά μια ποικιλία κυτταρικών υποστρωμάτων μεταξύ των οποίων και την πρωτεΐνη PARP (πολυ ADP-ριβόζη-πολυμεράση). Η PARP εδράζεται στον πυρήνα των κυττάρων και σχετίζεται με την επιδιόρθωση του DNA. Η διάσπαση της PARP από την κασπάση -3 έχει ως αποτέλεσμα τη μη επιδιόρθωση του DNA και την έναρξη της απόπτωσης. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η διάσπαση της PARP θεωρείται ασφαλής δείκτης της απόπτωσης. Για να διερευνηθεί αν η κυτταροτοξικότητα του *H. cyclophyllus* οφείλεται σε επαγωγή της απόπτωσης των A549 κυττάρων μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot οι συγκεκριμένες αποπτωτικές πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot:

- Η μείωση των επιπέδων της προκασπάσης -3 και η διάσπαση της πρωτεΐνης PARP δείχνουν ότι ο κυτταρικός θάνατος που προκαλεί το *H. cyclophyllus* στα A549 κύτταρα οφείλεται σε ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης.

4.3.2 Έλεγχος μορφολογίας A549 κυττάρων σε χρόνο και δοσοεξαρτώμενα πειράματα

Οι μορφολογικές αλλοιώσεις που προκαλεί το εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* στα A549 κύτταρα μελετήθηκαν έπειτα από κυτταροπλασματικές και πυρηνικές χρώσεις σε κύτταρα που συλλέχθηκαν από 3 ανεξάρτητα χρόνο- και δοσοεξαρτώμενα πειράματα.

Οι πρώτες μορφολογικές διαφοροποιήσεις των A549 κυττάρων παρατηρήθηκαν στην περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία λίγες ώρες μετά την επίδραση αποκτά κυματοειδή μορφή. Ενδοκυττάριο υλικό φαίνεται ότι περιφερειοποιείται, περιβάλλεται από μεμβράνη και απεκκρίνεται

με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης (4-6 ώρες). Με τη διαδικασία αυτή σχηματίζονται μεγάλα σε μέγεθος μικροκυστίδια που ονομάζονται εκτοσώματα (ectosomes). Τα εκτοσώματα διαφοροποιούνται από τα εξωσώματα (exosomes) ως προς το μέγεθός τους, το περιεχόμενό τους, το διαφορετικό τρόπο σχηματισμού και ελευθέρωσής τους (Sadallah et al. 2010). Το γεγονός ότι τα μικροκυστίδια έχουν πράσινη απόχρωση, όπως και το εκχύλισμα του *Helleborus* το οποίο εφαρμόσθηκε στα κύτταρα, δείχνει ότι φυτικής προέλευσης συστατικά έχουν διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, έχουν εισέλθει στο κυτοσόλιο και αποβάλλονται με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης μαζί με άλλο ίσως ενδοκυττάριο υλικό. Επειδή τα εκτοσώματα εκφράζουν ίχνη φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην εξωτερική τους μεμβράνη, διαθέτουν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιφλεγμονώδη ανοσοκατασταλτική δράση όμοια με αυτή των αποπτωτικών κυττάρων (Sadallah et al. 2010).

Ένα εικοσιτετράωρο μετά την επίδραση τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα της εξωκυττάρωσης, είναι αποκολλημένα, έχουν στρογγυλό σχήμα και μεγάλο μέγεθος. Στα περισσότερα κύτταρα παρατηρείται σχηματισμός ενός μεγάλου σε μέγεθος κυστιδίου εντός του κυτταροπλάσματος, το οποίο πολλές φορές διακρίνεται σαν σφαιρική μπάλα που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος. Το κυστίδιο βάφεται με ηωσίνη (όξινη χρωστική) και έχει μία ομοιογενή ροζ εμφάνιση. Συνήθως είναι τοποθετημένο δίπλα στον πυρήνα του κυττάρου σαν να συνεχεται με τον περιπυρηνικό χώρο, όπως και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο ή πιθανό και να εντοπίζεται στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Το κυστίδιο φαίνεται συνήθως να απωθεί τον πυρήνα στην περιφέρεια του κυττάρου. Οι δυνάμεις που ασκούνται από τα σχηματιζόμενα κυστίδια στον πυρήνα πιθανό να μεταβάλουν όχι μόνο το σχήμα του, αλλά και τη λειτουργικότητα και την έκφραση των γονιδίων του (Webster et al 2009). Σε πολλά κύτταρα διακρίνονται δύο ή περισσότεροι πυρήνες εντός του κυττάρου, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες κατά τη διαδικασία της κυτταροκίνησης. Ο σχηματισμός μικροπυρήνων, ο οποίος αρχίζει να διακρίνεται λίγες ώρες μετά την επίδραση, φαίνεται να οφείλεται σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot σε επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων, ενώ μετά από 48 ώρες επίδρασης έχουν απομείνει μόνο αποπτωτικά σωμάτια, κυτταρικά υπολείμματα και ελάχιστα κύτταρα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρούνται κύτταρα με περισσότερους των δύο πυρήνων που ποικίλλουν σε μέγεθος ή ορισμένοι ιδιαίτερα μεγάλοι σε μέγεθος πυρήνες, συγκριτικά με τους πυρήνες του μάρτυρα, στους οποίους διακρίνονται πολλά ενεργά πυρήνια. Σε ορισμένους από αυτούς τους πυρήνες παρατηρήθηκε ο σχηματισμός

θραυσμάτων χωρίς να παρατηρούνται μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης των κυττάρων, όπως συμπύκνωση της χρωματίνης και του κυτταροπλάσματος, ενώ σε ορισμένους απωθημένους στην περιφέρεια του κυττάρου πυρήνες παρατηρήθηκε καρυόλυση, κάτι που σχετίζεται με τη διαδικασία της νέκρωσης των κυττάρων.

Αν προσπαθήσουμε να ενώσουμε σαν παζλ την εικόνα που σχηματίζεται φαίνεται ότι φυτικής προέλευσης λιπόφιλα συστατικά εισέρχονται στο καρκινικό κύτταρο, το οποίο αρχικά φαίνεται να τα αποβάλλει με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης και το σχηματισμό εκτοσωμάτων. Αργότερα φαίνεται ότι το κύτταρο χάνει αυτή την ικανότητα, πιθανό λόγω “βλάβης” είτε του μηχανισμού της εξωκυττάρωσης είτε των κυτταρικών οργανιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία. Ο σχηματισμός του κυστιδίου ίσως να αφορά έναν δεύτερο μηχανισμό άμυνας του κυττάρου για να αποθηκεύονται εκεί τα προϊόντα τα οποία επρόκειτο να αποβληθούν από το κύτταρο με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης. Λόγω της δράσης του εκχυλίσματος τα καρκινικά κύτταρα αποκολλώνται από το υπόστρωμά τους και ευαισθητοποιούνται στο αποίκis, αυτοκαταστρέφονται δηλαδή με αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα προαναφερόμενα φαινόμενα λαμβάνουν χώρα επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549. Τα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα (ινοβλάστες) τα οποία δέχθηκαν την επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης ήταν φυσιολογικά, δεν παρουσίασαν δηλαδή μορφολογικές διαφοροποιήσεις συγκριτικά με το μάρτυρα.

Τα κυστίδια που παρατηρήθηκαν έπειτα από επίδραση με εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* φαίνεται ότι παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με δομές γνωστές ως υαλώδη σφαιρίδια, συνώνυμα των οποίων θεωρούνται τα σωματίδια Mallory's, τα σωματίδια Russell και τα θανατοσώματα (D' Alfonso et al 2013). Ο όρος θανατοσώματα για τα υαλώδη σφαιρίδια προτάθηκε από τους Papadimitriou et al. (2000) για να δοθεί έμφαση στη σχέση τους με τον κυτταρικό θάνατο. Ο σχηματισμός αυτών των δομών έχει παρατηρηθεί σε κακοήθεις και καλοήθεις όγκους, αλλά και μη νεοπλασματικούς ιστούς, κυρίως ενδοκυττάρια και σπάνια εξωκυττάρια. Βάφονται ομοιογενώς με όξινες χρωστικές και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η παρουσία τους σχετίζεται με τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Papadimitriou et al 2000, D' Alfonso et al 2013). Μπορεί να εμφανίζονται ως συμπυκνωμένες κυτταροπλασματικές περιοχές περιβαλλόμενες από αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο ή ως φαγοσώματα/δευτερογενή λυσοσώματα (Papadimitriou et al 2000). Η σημαντικότητα και η φύση των θανατοσωμάτων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι απαντώνται συχνά σε μεταστατικές περιοχές καρκίνου (Hes et al. 1998, D' Alfonso et al. 2013).

Σύμφωνα με δικές μας παρατηρήσεις τα A549 καρκινικά κύτταρα, που περιέχουν δομές που μοιάζουν με θανατοσώματα είναι αποκολλημένα από το υπόστρωμά τους. Αν αυτά τα κύτταρα επιβιώσουν μπορεί να αποικίσουν σε κάποιο άλλο σημείο και να κάνουν μεταστάσεις. Στην περίπτωση όμως που τα αποκολλημένα καρκινικά κύτταρα αποπίπτουν, όπως φαίνεται από τον έλεγχο της μορφολογίας, η περαιτέρω έρευνα του εκχυλίσματος για την αντικαρκινική του δράση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

4.3.3 Βιοδραστικά συστατικά- πιθανός τρόπος δράσης

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το γένος *Helleborus* (Ranunculaceae), χαρακτηρίζεται από την παρουσία αλκαλοειδών, σαπωνινών και καρδιακών γλυκοζιτών, που ανήκουν στην κατηγορία των μπουφαδιενολιδίων (Stochmal et al. 2010). Η επιλεκτική δράση των συστατικών του εκχυλίσματος στα καρκινικά κύτταρα A549 μπορεί να οφείλεται στα εξής:

- Σε συστατικά που ενεργοποιούν το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι μέσω των υποδοχέων TRAIL-R1/DR4 ή TRAIL-R2/DR5, οι οποίοι εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και διαθέτουν λειτουργικές περιοχές θανάτου, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα εκφράζονται TRAIL υποδοχείς, χωρίς ανάλογες λειτουργικές περιοχές.
- Σε καρδιακούς γλυκοζίτες που δρουν στην αντλία Καλίου-Νατρίου.

Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένοι καρδιακοί γλυκοζίτες, όπως οι oleadrin, bufalin, digitoxin και digoxin, ενεργοποιούν την απόπτωση σε μη μικροκυτταρικά καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μέσω των TRAIL υποδοχέων DR4, DR4 (Frese et al. 2006).

Η αντλία Νατρίου-Καλίου ή ΑΤΡάση Na-K είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη – αντλία, η οποία συνδυάζει την είσοδο ιόντων καλίου με την έξοδο ιόντων νατρίου από το κύτταρο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Prassas et al. 2011, Trenti et al. 2014) οι καρδιακοί γλυκοζίτες έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στην αντλία Καλίου-Νατρίου και να την αναστέλλουν. Σύμφωνα με πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες καρδιακοί γλυκοζίτες (digoxin, digitoxin), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας και της καρδιακής αρρυθμίας, παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (Prassas et al. 2011, Cerella et al. 2013). *In vitro* μελέτες επιβεβαιώνουν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι καρδιακοί γλυκοζίτες (nanomolar) ενεργοποιούν την απόπτωση και εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα, χωρίς να παρατηρείται κάποια επίδραση σε φυσιολογικά κύτταρα (Prassas et al. 2008, Prassas et al.

2011, Trenti et al. 2014, Pongrakhananon 2013). Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της επίδρασης των καρδιακών γλυκοζιτών δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί (Prassas et al. 2008, Cerella et al. 2013). Έχει όμως διαπιστωθεί ότι η αντλία διαθέτει ρυθμιστικές περιοχές φωσφοριλίωσης σηματοδοτικών κινασών (PI3K, PKC, PKA), καβεολινών και ανκυρινών, κάτι που οδηγεί σε σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού σηματοδοτικού συμπλόκου (Prassas et al. 2008), μέσω του οποίου μεταβιβάζεται το μήνυμα των καρδιακών γλυκοζιτών στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αντλία απαρτίζεται από α και β υπομονάδες. Υπάρχουν 4α και 3β ισομορφές της Na-K ATPάσης με διαφορετικά χαρακτηριστικά και διαφορετική ευαισθησία σε μία ποικιλία καρδιακών γλυκοζιτών, γεγονός που επιτρέπει πολυάριθμους συνδυασμούς αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους ιστούς (Γριβέας κ.ά 2012). Η διαφορετική έκφραση και δράση των υπομονάδων της K-Na ATPάσης σε καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην διαφορετική τους απόκριση. Έχει διαπιστωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μία σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα της Na^+ / K^+ ATPάσης.

Η αντλία Καλίου – Νατρίου συμμετέχει σε μια ποικιλία βιολογικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης (Γριβέας κ.ά. 2012, Mijatovic et al. 2007) και της οσμωτικής ρύθμισης του κυτταρικού όγκου. Το γεγονός ότι τα A549 κύτταρα 24 ώρες μετά την επίδραση ήταν αποκολλημένα και διογκωμένα μπορεί να σχετίζεται με τη δράση καρδιακών γλυκοζιτών στην αντλία Καλίου-Νατρίου, αλλά και στην ευαισθητοποίηση των αποκολλημένων καρκινικών κυττάρων στο ανοίκισ. Σύμφωνα με τους Simpson et al. (2009) πέντε καρδιακοί γλυκοζίτες (ouabain, peruvoside, digoxin, digitoxin, and strophanthidin) έχει διαπιστωθεί ότι ευαισθητοποιούν τα ανθεκτικά PPC-1 αδενοκαρκινικά κύτταρα του προστάτη στο ανοίκισ.

Σημειώνεται, ότι το πολυετές ρίζωμα των φυτών, στο οποίο περιέχονται τα τοξικά γλυκοζίδια Ελλεβορεΐνη και Ελλεβορίνη, δεν είχε καμία επίδραση στα καρκινικά κύτταρα A549 σε αντίθεση με το εκχύλισμα των φύλλων. Αν η βιοδραστηριότητα του εκχυλίσματος οφείλεται σε καρδιακούς γλυκοζίτες φαίνεται ότι θα πρόκειται για κάποια άλλα μέλη των καρδιακών γλυκοζιτών τα οποία περιέχονται αποκλειστικά και μόνο στα φύλλα. Αν λάβουμε υπόψη μας ότι το συγκεκριμένο είδος παράγει αλκαλοειδή (Hanlidou et al. 1998) τα οποία στα περισσότερα είδη των φυτών βιοσυντίθενται στο υπέργειο μέρος, με εξαίρεση την νικοτίνη στον καπνό, δημιουργείται η σκέψη πως πιθανό τα συστατικά αυτά να συμμετέχουν στη βιοδραστηριότητα του εκχυλίσματος.

4.4 Βιολογικές δράσεις *S. horvatii* spp. *macrophylla*

4.4.1 Αεριοχρωματογραφική ανάλυση (GC-MS) *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

4.4.1.1 Αιθέριου ελαίου

Σύμφωνα με τους Dardioti *et al.* (2010) η ποιοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου που παράγει το είδος *S. horvatii* ssp. *macrophylla* εξαρτάται από την βιοκλιματική ζώνη που αναπτύσσεται. Έχουν διαπιστωθεί τρεις χημειότυποι, ένας με κύριο συστατικό την καρβακρόλη (Carvacrol), ένας με κύριο συστατικό την λιναλοόλη (Linalool) ή το ένυδρο trans- σαβινένιο (trans-Sabinene hydrate) και / ή τη βορνεόλη (Borneol) και ο χημειότυπος της θυμόλης (Thymol). Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο (1,5 %), το οποίο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης με GC-MS αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια (88-86 %)* και χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε καρβακρόλη (Carvacrol) (42-48 %), ενώ η άλλη τερπενική φαινόλη η θυμόλη (Thymol) αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του αιθέριου ελαίου (6-3 %). Υψηλή είναι επίσης η περιεκτικότητα στους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες p-cymene (12-13 %) και γ-terpinene (5 -6 %), που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις βιοσύνθεσης των δύο φαινολών. Τα τέσσερα (4) αυτά συστατικά συνιστούν το 65 -70 % του αιθέριου ελαίου. Το πέμπτο (5^ο) συστατικό το οποίο περιέχεται σε ποσοστό πάνω από 5% είναι το οξυγονωμένο μονοτερπένιο Borneol (5 -6 %). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις διαπιστώσεις των Dardioti *et al.* (2010) αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθέριου ελαίου των φυτών που φύονται στη μεσογειακή βιοκλιματική ζώνη. Από τα σεσκιτερπένια τα οποία αποτελούν το (10%) των συστατικών, επικρατεί το caryophyllene (4-5 %) και σε μικρότερο ποσοστό το Caryophyllene oxide (2%).

Από τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν, είκοσι δύο (22) αναφέρονται για πρώτη φορά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ως συστατικά του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* (Δαρδιώτη 2005, Dardioti *et al.* 2010). Από τα συστατικά αυτά τα Thymol methyl ether (0.72-3.13 %), α-Thujene (0.81-1.30 %), p-Cymen-8-ol (0.19-0.26 %), Terpinolene (0.07-0.18 %), α-Phellandrene (0.08-0.23%), Aromadendrene (0.53-0.14 %), α-Humulene (0.03-0.17 %), γ-Murolene (n.d -0.04 %), δ-Cadinene (0.03-0.18 %), Sabinene (n.d -0.01 %), δ 3-carene (0,04-0 %) έχουν αναφερθεί ως συστατικά του υποείδους *S. horvatii* ssp. *horvatii* το οποίο φύεται στην Γιουγκοσλαβία (Lacusic *et al.* 2008, Lakusic *et al.* 2011) και του είδους *S. montana* (Rzepa *et al.* 2012, Scocibusic & Bezie 2004, Bezie *et al.* 2005, Bezie *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2012, Panizzi *et al.* 1993, Fraternale *et al.* 2007, Marin *et al.* 2012, Cavar *et al.* 2008, Lopez-Reyes *et al.* 2010, Mastelic & Jerkovic 2003). Τα συστατικά 3-Octanol (0.09-1.12 %), Dihydrocarvone (n.d -0.11 %), Thymoquinone (0.10-0.19 %), cis-Verbenol (0.08-0.10 %) έχουν

αναφερθεί ως συστατικά του *S. montana* (Marin *et al.* 2012, Cavar *et al.* 2008, Dunkie *et al.* 2012). Για πρώτη επίσης φορά αναφέρονται τα συστατικά *o*-Cymene (n.d -0,01 %), *trans*-pinocarveol (0.02-0.08 %), α -Gurjunene (tr-0.08 %), Alloaromadendrene (tr-0.05 %), γ -Elemene (0.17-0.24 %), (+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene (tr-0.01 %), α -Bisabolol (0.02 -0.04 %).

Σε ποσοστό μικρότερο από ίσο ή μικρότερο από 0.1 % περιέχονται δεκαπέντε (16) συστατικά *b*-pinene, *o*-Cymene, (+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene, Alloaromadendrene, α -Gurjunene, *cis*-Ocimene, -Dihydrocarvone, α -Bisabolol, Camphor, *trans*-pinocarveol, γ -Cadinene, *cis*-Verbenol, Dihydrocarvone, Germacrene D, γ -Muurolene, δ 3-carene. Τα 5 πρώτα από αυτά δεν ανιχνεύθηκαν στο αιθέριο έλαιο που παραλήφθηκε από λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό.

Τα συστατικά carvacrol, thymol, thymoquinone είναι οξυγονωμένα τερπένια με σημαντικές βιολογικές δράσεις. Το συστατικό thymoquinone αναφέρεται για πρώτη φορά ως συστατικό του είδους *S. horvatii* ssp. *macrophylla*. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το είδος *Nigella sativa* (Ranunculaceae) (El-Dakhkhany 1963), αλλά έχει αναφερθεί και ως συστατικό στο αιθέριο έλαιο του *S. montana* (Cavar *et al.* 2008, Marin *et al.* 2012). Τα Carvacrol και Thymol είναι συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο των αρωματικών φυτών που ανήκουν στο γένος *Origanum*, *Coridothymus*, *Satureja* (Kokkini & Vokou 1989).

4.4.1.2 Μεθανολικό εκχύλισμα

Με GC-MS ανάλυση διερευνήθηκε η ποιοτική σύσταση του μεθανολικού εκχυλίσματος σε πτητικά συστατικά. Διαπιστώθηκε ότι όλα τα συστατικά, τα οποία περιέχονται στο αιθέριο έλαιο σε ποσοστό μεγαλύτερο από (0.1 %), ανιχνεύονται στο μεθανολικό εκχύλισμα. Το μεθανολικό εκχύλισμα αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια (91%) από τα οποία το 56% είναι οξυγονωμένα, ενώ τα σесκιτερπένια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό (6%). Σε σημαντικό ποσοστό (43%) περιέχεται η καρβακρόλη. Το οξυγονωμένο μονοτερπένιο thymoquinone, το οποίο αποτελεί μικρό ποσοστό του αιθέριου ελαίου (0.09 %), περιέχεται σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό στο μεθανολικό εκχύλισμα (2.93 %).

4.4.1.3 Υδατικό εκχύλισμα εφαρμογής

Παρόλο που το MeOH εκχύλισμα είναι πλούσιο σε πτητικά συστατικά το μεγαλύτερο μέρος από αυτά διαπιστώθηκε ότι δεν περιέχεται στο εκχύλισμα εφαρμογής. Πολλά από αυτά τα συστατικά απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της αποξήρανσης του μεθανολικού εκχυλίσματος (40 °C,

ατμόσφαιρα N₂), η οποία είναι μία διαδικασία που συνοδεύεται από χαρακτηριστική οσμή. Το αποξηραμένο εκχύλισμα αναδιαλύθηκε πριν την εφαρμογή του στα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, το οποίο είναι ένα υδατικό μέσο. Τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν είναι λιπόφιλα συστατικά με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Στους δύο αυτούς λόγους φαίνεται να οφείλεται η μικρή περιεκτικότητα του διαλύματος εφαρμογής σε πτητικά συστατικά.

4.4.1.4 Ανάλυση (DHS-GC-MS) πτητικών ενώσεων του φυτικού ιστού

Με την (DHS-GC-MS) ανάλυση του φυτικού ιστού επιβεβαιώθηκε ότι, με επώαση τους 40 °C, απομακρύνονται και ταυτοποιούνται (Πίνακας 15) όλοι οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, που περιέχονται και στο μεθανολικό εκχύλισμα (Πίνακας 14), καθώς και τα οξυγονωμένα μονοτερπένια monoterpens 1,8-Cineole, trans Sabinene hydrate, Linalool, και Thymol methyl ether.

4.4.2 Έλεγχος αντικαρκινικής δράσης του αρωματικού φυτού *S. horvatii* spp. *macrophylla*

4.4.2.1 Έλεγχος μορφολογίας A549 κυττάρων σε χρόνο και δοσοεργάσιμα πειράματα

Έπειτα από χρώση των A549 κυττάρων με ηωσίνη – αιματοξυλίνη, DAPI και μικροσκοπικό έλεγχο της μορφολογίας τους διαπιστώθηκαν τόσο μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης, όπως πύκνωση των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος, σχηματισμός μικροπυρήνων και αποπτωτικών σωματίων, όσο και χαρακτηριστικά νέκρωσης όπως διόγκωση των κυττάρων, σχηματισμός συσσωματωμάτων χρωματίνης και κενοδοπίων. Ο σχηματισμός κενοδοπίων στο κυτταρόπλασμα είναι συχνό, αλλά όχι σταθερό χαρακτηριστικό της απόπτωσης των κυττάρων (Alberts et al. 2000), ενώ αποτελεί μορφολογικό χαρακτηριστικό της νέκρωσης των κυττάρων (Edinger & Thompson 2004, Jin & El-Deiry, 2005).

Από τον έλεγχο της μορφολογίας των κυττάρων φαίνεται ότι η αργή καταμέτρηση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (10 mg mL⁻¹, 24 ώρες), οφείλεται στην ολοκλήρωση της αποπτωτικής διαδικασίας σε ένα μέρος του κυτταρικού πληθυσμού. Αντίθετα στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (20 mg mL⁻¹, 24 ώρες) οι πυκνωμένοι πυρήνες και ο κανονικός ρυθμός καταμέτρησης των κυττάρων δείχνουν ότι η απόπτωση των κυττάρων έχει ξεκινήσει αλλά δεν έχει ολοκληρωθεί.

Επειδή η απόπτωση είναι μία διαδικασία που ολοκληρώνεται μέσα σε 2-3 ώρες από την έναρξή της (Elmore 2007), φαίνεται ότι η παρουσία μεγάλου ποσοστού πυκνωμένων πυρήνων (20 mg mL⁻¹) μετά από 48 ώρες επίδρασης, καθώς και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων χρωματίνης (10 mg mL⁻¹)

¹, 48 ώρες), μπορεί να σχετίζονται με την εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου ή με την αναστολή της ενεργότητας των κασπασών. Οι δύο αυτοί είναι παράγοντες μπορεί να λειτουργήσουν ως διακόπτης και να τρέψουν το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου από αποπτωτικό σε νεκρωτικό (Nicoletopoulou et al. 2013, Kitataka & Kuchino 1999).

4.4.2.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western blot

Τα μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης -3 επιβεβαιώνουν την προαποπτωτική δράση του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* σε A549 κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος.

4.4.2.3 Βιοδραστικότητα συστατικών εφαρμοζόμενου μεθανολικού εκχυλίσματος στα A549 κύτταρα

Η απόπτωση που προκαλεί το *S. horvatii* ssp. *macrophylla* στα A549 κύτταρα δεν αυξάνει αυξανόμενης της συγκέντρωσης. Μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης παρατηρήθηκε στη “χαρακτηριστική συγκέντρωση” σε κύτταρα με νεκρωτική μορφολογία (διογκωμένα). Αρχικά διατυπώθηκε η σκέψη ότι η διόγκωση των κυττάρων μπορεί να οφείλεται σε λιπόφιλα συστατικά (τερπένια), τα οποία αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη και επηρεάζουν τη σύσταση των φωσφολιπιδίων και τη διαπερατότητά της. Η σκέψη αυτή φαίνεται να απορρίπτεται, επειδή αυξανόμενης της συγκέντρωσης μειώνεται η ένταση των φαινομένων, τόσο οι μορφολογικές αλλοιώσεις (διόγκωση των κυττάρων) όσο και το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων, αλλά και το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου γενικότερα. Όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα των αναλύσεων το υδατικό εκχύλισμα, το οποίο εφαρμόστηκε στα καρκινικά κύτταρα A549, είχε πολύ μικρότερη περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά συγκριτικά με το MeOH εκχύλισμα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα συστατικά όπως η καρβακρόλη (Carvacrol), η θυμόλη (Thymol) (Ozkan & Erdogan 2012) και η θυμοκινόνη (Thymoquinone) (Woo 2012), τα οποία περιέχονται στο υδατικό εκχύλισμα εφαρμογής, παρουσιάζουν οξειδωτική ή αντιοξειδωτική δράση ανάλογα με τη συγκέντρωση και τον τύπο των κυττάρων. Η οξειδωτική-αντιοξειδωτική δράση αυτών των συστατικών ανάλογα με τη συγκέντρωση και η παραγωγή ROS θα μπορούσε να εξηγήσει την ενεργοποίηση της απόπτωσης με νεκρωτική μορφολογία σε ορισμένες συγκεντρώσεις και τη μείωση της έντασης των φαινομένων αυξανόμενης της συγκέντρωσης.

Είναι γνωστό ότι η καρβακρόλη (Carvacrol) διαθέτει αντιοξειδωτική (Yanishlieva et al 1999), αντιφλεγμονώδη (Landa et al 2009), αντιμικροβιακή (Veldhuizen et al 2006), εντομοκτόνο (Ahn et al

1998) δράση, είναι αναστολέας της AChE (Jukic 2007) και παρουσιάζει αντιμεταστατική (Arunasree 2010), αντιυποπλασιαστική (Patel et al 2012) και αποπτωτική δράση (Liang & Lu 2012, Kopardal & Zeytinoglu 2003) σε συγκεκριμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Η θυμοκινόνη (thymoquinone) παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, και αντικαρκινική δράση σε ένα ευρύ φάσμα καρκινικών κυττάρων. Η αντικαρκινική δράση μεσολαβείται μέσω διαφορετικών τρόπων δράσης όπως είναι η επαγωγή της απόπτωσης, η αντιυποπλασιαστική δράση, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η παραγωγή ROS και η αντιμεταστατική δράση (Woo et al 2012). Σύμφωνα με τους Jafri et al. (2010) ο συνδυασμός θυμοκινόνης με το cisplatine που αποτελεί τον πιο δραστικό χημειοθεραπευτικό παράγοντα, παρουσίασε συνεργηστική δράση σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα και μπορεί να είναι ένας δραστικός θεραπευτικός συνδυασμός για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Το terpinene 4 ol συστατικό που περιέχεται σε μικρό ποσοστό στο εφαρμοζόμενο εκχύλισμα (0,25 %) έχει διαπιστωθεί ότι ενεργοποιεί την απόπτωση σε A549 και CL 1-0 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού (Wu et al 2012). Το συστατικό αυτό προκαλεί απόπτωση σε ανθρώπινα M14 κύτταρα μελανώματος μέσω αλληλεπίδρασης με την κυτταρική μεμβράνη και την αναδιοργάνωση των λιπιδίων της μεμβράνης (reorganization of membrane lipids) (Calcabrini et al 2004).

Επισημαίνεται, ότι η βιοδραστικότητα ενός φυτικού εκχυλίσματος είναι το αποτέλεσμα της συνεργηστικής δράσης των επιμέρους συστατικών του. Διαφορετικά συστατικά είναι δυνατό να ενεργοποιήσουν διαφορετικό βιοχημικό μονοπάτι και να οδηγήσουν ένα καρκινικό κύτταρο στον κυτταρικό θάνατο. Το κύτταρο για να επιβιώσει θα πρέπει να αντιμετωπίσει τους διαφορετικούς μηχανισμούς και επομένως η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας φαίνεται να είναι πολύ πιο δύσκολη συγκριτικά με τη χρήση μίας συγκεκριμένης δραστικής ουσίας.

4.4.3 Έλεγχος αντιμυκητικής δράσης

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση φυτικής προέλευσης συστατικών με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες για την αντιμετώπιση των φυτοπαρασίτων, λόγω αφενός μεν της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα συνήθως χρησιμοποιούμενα συνθετικά φυτοπροστατευτικά μέσα και αφετέρου λόγω των αρνητικών συνεπειών της χρήσης τους σε οργανισμούς μη στόχους. Στο πλαίσιο αυτό μελετάται, εκτός των άλλων, η χρήση των αιθέριων ελαίων για την αντιμετώπιση

φυτοπαθογόνων μυκήτων. Ενδιαφέρον ανάμεσα σε αυτά παρουσιάζουν τα γένη της οικογένειας Lamiaceae *Salvia*, *Origanum*, *Lavandula*, *Rosmarinus*, (Daferera et al. 2000, Soylu et al 2010), *Thyme* (Feng et al 2011), *Satureja* (Fraternal et al 2007), *Ocimum*, *Mentha* (Lopez-Reyes et al 2013) κ.ά. Το γένος *Satureja* περιλαμβάνει είδη με αντιμυκητική δράση όπως τα *S. thymbra* (Glamoclija et al. 2006, Gormez & Diler 2014, Marković et al. 2011), *S. montana* (Marin et al. 2012, Fraternal et al. 2007, Lopez-Reyes et al 2010) και *S. hortensis* (Azizi et al. 2008).

Μετά τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα της επίδρασης του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* στα A549 καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα διερευνήθηκε η βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος (υδατική φάση αποξηραμένου MeOH εκχυλίσματος) και του αιθέριου ελαίου σε τρία είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων τα οποία προσβάλουν την τομάτα. Η τομάτα αποτελεί τη δεύτερη πιο σημαντική λαχανοκομική καλλιέργεια στη χώρα μας, μετά την πατάτα και έχει τεράστια διατροφική και οικονομική αξία. Οι μύκητες του γένους *Alternaria* και *Botrytis* προκαλούν τις πιο συχνές προσβολές τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά, ενώ το εδαφογενές παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* προκαλεί αδρομύκωση στα φυτά της τομάτας. Η υποκαπνιστική αντιμυκητική δράση των αιθέριων ελαίων παρουσιάζει ενδιαφέρον για την προστασία φρούτων και λαχανικών από μετασυλλεκτικές σήψεις λόγω της εύκολης εφαρμογής τους και της ελάχιστης μεταχείρισης των προϊόντων.

Με την μέθοδο της διάχυσης, διαπιστώθηκε ότι το αιθέριο έλαιο επηρεάζει την βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου και για τα τρία φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές, ενώ το εκχύλισμα δεν παρουσίασε καμία ορατή αναστολή στην ανάπτυξη των μυκήτων ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (20 mg d.w. mL⁻¹ θρεπτικού). Από τα αποτελέσματα της GC-MS ανάλυσης του αιθέριου ελαίου και του μεθανολικού εκχυλίσματος, διαπιστώθηκε ότι όλα τα συστατικά, που περιέχονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1% στο αιθέριο έλαιο, παραλαμβάνονται και περιέχονται στο MeOH εκχύλισμα. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εκχυλίσματος εφαρμογής με GC-MS, ένα μικρό μόνο μέρος των πτητικών συστατικών του MeOH εκχυλίσματος περνούν στο εκχύλισμα εφαρμογής, αφενός μεν λόγω της απώλειας πτητικών συστατικών κατά τη διάρκεια αποξήρανσης του MeOH εκχυλίσματος και αφετέρου λόγω της λιπόφιλης φύσης και μικρής διαλυτότητας των συστατικών που έχουν απομείνει στο νερό.

Στα *in vitro* πειράματα που αφορούν την μελέτη της βιοδραστικότητας του αιθέριου ελαίου στα επιλεγμένα φυτοπαθογόνα, καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου (υποκαπνιστική δράση) συγκριτικά με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης του αιθέριου ελαίου στο θρεπτικό υλικό (PDA) και την εξ επαφής δράση. Κάτι ανάλογο έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές (Feng et al. 2011) που σημειώνουν πως αυτό οφείλεται στη λιπόφιλη φύση των συστατικών του αιθέριου ελαίου, τα οποία προσρροφώνται καλύτερα από την επίσης λιπόφιλη μυκηλιακή υφή συγκριτικά με το υψηλής περιεκτικότητας σε νερό θρεπτικό υλικό (Inouye et al 2000, Edris & Farrag 2003, Soylu et al 2010, Laird & Phillips 2011). Εκτός αυτού σημειώνεται, ότι κατά τη διαδικασία ενσωμάτωσης του αιθέριου ελαίου στο θρεπτικό υλικό (40 -45°C) ήταν αντιληπτή μία χαρακτηριστική οσμή, η οποία οφείλεται σε συστατικά που μεταβαίνουν σε αέρια κατάσταση και απομακρύνονται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα της DHS-GC-MS ανάλυσης επιβεβαιώνουν την απομάκρυνση συγκεκριμένων πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου, έπειτα από επώαση στους 40 °C. Παρόλο δηλαδή που χρησιμοποιείται η ίδια ποσότητα αιθέριου ελαίου στις δύο μεθόδους η πραγματική συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ανά τρυβλίο με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης είναι μικρότερη λόγω απωλειών.

Για όλα τα είδη μυκήτων η δράση του αιθέριου ελαίου στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μυκοστατική και όχι μυκοτοξική. Η αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου ήταν εξαρτώμενη από το είδος του μύκητα και από τη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου. Η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC) στα πειράματα που αφορούν την μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων του αιθέριου ελαίου στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* υπολογίσθηκε σε 123 $\mu\text{L L}^{-1}$ αέρα, ενώ για το είδος *A. alternata* η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC) ήταν μικρότερη (100 $\mu\text{L L}^{-1}$). Παρόλα αυτά η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC 50) υπολογίσθηκε σε 1.02 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, σε 2.62 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το είδος *A. alternata* και 2.17 $\mu\text{L L}^{-1}$ για το *B. cinerea* (6^η μέρα), κάτι που φαίνεται να οφείλεται στον διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης των μυκήτων.

4.4.3.1 Βιοδραστικότητα αιθέριου ελαίου στα επιλεγμένα φυτοπαθογόνα

Το αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla* που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές ανήκει στον χημειότυπο της καρβακρόλης, ενώ η τερπενική φαινόλη θυμόλη περιέχεται σε μικρότερο ποσοστό. Η υψηλή περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε καρβακρόλη φαίνεται ότι επηρεάζει την

μυκηλιακή ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα τα αιθέρια έλαια στα οποία κυριαρχούν οι τερπενικές φαινόλες καρβακρόλη ή θυμόλη, όπως τα *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*, *Satureja montana* και *Thyme* sp. παρουσιάζουν σημαντική επίδραση σε παθογόνα που προκαλούν μετασυσπληκτικές σήψεις όπως τα *B. cinerea* (Vitoratos et al. 2011, Lopez-Reyes et al. 2010, Daferera et al. 2003, Hassani et al. 2012) και *A. alternate* (Feng et al. 2011) , ενώ σύμφωνα με τους Kadoglidou et al. (2011) το αιθέριο έλαιο του *O. vulgare* L. ssp. *hirtum* αναστέλλει την ανάπτυξη του *F. oxysporum*, ενός σημαντικού παθογόνου μύκητα που προσβάλλει την τομάτα. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι ισομερή θέσης. Η διαφορετική θέση του υδροξυλίου στο φαινολικό τους δακτύλιο επηρεάζει το βαθμό της αντιμυκητικής (Ahmad et al. 2011) και αντιμικροβιακής τους δράσης (Burt 2004)

Εκτός από τις τερπενικές φαινόλες και άλλα συστατικά όπως τα 1,8-cineole και limonene (Marei et al. 2012), camphor, sabinene, terpinens, α-pinene, β-pinene και caryophyllen oxide, τα οποία περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του *S. horvatii* spp. *macrophylla* έχουν διαπιστωμένα παρουσιάζει αντιμυκητική δράση σε παθογόνους ή φυτοπαθογόνους μύκητες (Koroch et al. 2007) .

4.5 Περαιτέρω έρευνα

4.5.1 *H. cyclophyllus*

Το εκχύλισμα του *H. cyclophyllus* παρουσίασε ιδιαίτερα ενδιαφέροντα και ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη που αφορά το εναρκτήριο ερέθισμα της αποπτωτικής διαδικασίας. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητα τα εξής:

- Ο διαχωρισμός του MeOH εκχυλίσματος με HPLC σε κλάσματα και ο εντοπισμός του βιοδραστικού κλάσματος με βιοδοκιμές σε A549 κύτταρα.
- Δεδομένου ότι η βιοδραστικότητα παρατηρήθηκε μόνο στο εκχύλισμα των φύλλων και όχι σε εκείνο του ριζώματος θεωρείται, ότι η χρωματογραφική ανάλυση των δύο MeOH εκχυλισμάτων με HPLC θα συμβάλει στον εντοπισμό του βιοδραστικού κλάσματος.
- Η ανάλυση του βιοδραστικού κλάσματος με LC-MS για τον εντοπισμό του βιοδραστικού ή των βιοδραστικών συστατικών.
- Ο έλεγχος της κυτταροξικότητας του βιοδραστικού κλάσματος σε άλλες σειρές επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων.

- Ο *in vivo* έλεγχος της επίδρασης του βιοδραστικού κλάσματος σε πειραματόζωα, καθώς και ο έλεγχος για την παρουσίαση ή όχι μεταστάσεων.

Η μελέτη της σηματοδοτικής οδού της απόπτωσης των A549 κυττάρων παρουσιάζει ενδιαφέρον για την κατανόηση του φαινομένου που παρατηρείται. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η διερεύνηση:

- Της έκφρασης των εναρκτήριων κασπασών, κασπάσης -8 (εξωγενές μονοπάτι) και κασπάσης -9 (ενδογενές μονοπάτι).
- Του πιθανού στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο μπορεί ενεργοποιήσει την κασπάση -12 που εδράζεται σε αυτό και να οδηγήσει σε απόπτωση.
- Της έκφρασης ογκοκαταστατικών γονιδίων, της πρωτεΐνης p53 και των ογκοκατασταλικών πρωτεϊνών της υπερικογένειας Bcl2 των πρωτεϊνών.

Η ταξινόμηση των μικρών κυστιδίων, τα οποία παράγονται με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης στην τάξη των εκτοσωμάτων, βασίσθηκε στο μέγεθός τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο έλεγχος:

- Του περιεχομένου τους και του λειτουργικού τους ρόλου.
- Της αναγνώρισης και της απομάκρυνσής τους με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από μακροφάγα.
- Του πιθανού σχηματισμού μικρότερων σε μέγεθος κυστιδίων, τα οποία ανήκουν στην τάξη των εξωσωμάτων. Η παρατήρησή τους δεν είναι δυνατή σε οπτικό μικροσκόπιο λόγω του μικρού τους μεγέθους (30–100 nm).

Για τα μεγάλα σε μέγεθος κυστίδια τα οποία σχηματίζονται στο κύτταρο, λόγω των ομοιοτήτων που προαναφέρθηκαν, πιστεύεται ότι ανήκουν σε δομές που είναι γνωστές ως θανατοσώματα. Απαραίτητος θεωρείται ο έλεγχος:

- Της παρουσίας τους έπειτα από χρώση με άλλες χρωστικές π.χ Masson' s τρίχρωμη χρώση, Periodic acid Schiff (PAS).
- Του λειτουργικού τους ρόλου.
- Του περιεχομένου τους.
- Της σχέσης τους με το ενδοπλασματικό δίκτυο και την απόπτωση των κυττάρων.

4.5.2 *S. horvatii* ssp. *macrophylla*

4.5.2.1 Αντικαρκινική δράση

Το εκχύλισμα του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* διαπιστώθηκε ότι προκαλεί τόσο απόπτωση όσο και νέκρωση σε καρκινικά κύτταρα A549. Εκτός από την ποιοτική σύσταση του εκχυλίσματος σε πτητικά συστατικά που μελετήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ενδιαφέρον παρουσιάζει:

- Η ποιοτική σύσταση τόσο του MeOH εκχυλίσματος όσο και του εκχυλίσματος εφαρμογής σε μη πτητικά συστατικά με LC-MS. Αναμένεται, ότι στο MeOH εκχύλισμα περιέχονται φαινολικά οξέα τα οποία μπορεί να επηρεάζουν τη βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος.
- Η διερεύνηση της σηματοδοτικής οδού και του ρόλου του οξειδωτικού στρες στην απόπτωση.

4.5.2.2 Αντιμυκητική δράση

Το αιθέριο έλαιο του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων *B. cinerea* και *A. alternata* που προκαλούν μετασυλλεκτική σήψη στους καρπούς της τομάτας και του εδαφοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* που προκαλεί αδρομύκωση στα φυτά της τομάτας. Θα πρέπει να ελεγχθο :

- Αν το αιθέριο έλαιο επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού και την ανάπτυξη της ωφέλιμης μικροχλωρίδας.
- Η δυνατότητα χρήσης του αιθέριου ελαίου σε υλικά συσκευασίας τυποποιημένης τομάτας.
- Η αξιοποίηση της υποκαπνιστικής δράσης του αιθέριου ελαίου σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες για την προστασία των φυτών από φυτοπαθογόνους μύκητες και η επίδρασή τους σε οργανισμούς μη στόχους.

Συμπεράσματα

Όπως διαπιστώθηκε από τις βιοδοκιμές σε καρκινικά κύτταρα A549, το εκχύλισμα φύλλων του φαρμακευτικού φυτού *H. cyclophyllus* (οικογένεια: Ranunculaceae) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη της αντικαρκινικής του δράσης, λόγω της ικανότητάς του να επάγει επιλεκτικά την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα (πνευμονικούς ινοβλάστες). Πριν την ενεργοποίηση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα A549 παρατηρήθηκαν μία σειρά από φαινόμενα, τα οποία σχετίζονται με την εξωκυττάρωση ενδοκυττάρων συστατικών (σχηματισμός εκτοσωμάτων), την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από το υπόστρωμά τους και το σχηματισμό ενός μεγάλου σε μέγεθος κυστιδίου εντός του κυτταροπλάσματος που πιθανό να σχετίζεται με δομές γνωστές ως θανατοσώματα. Τελικά, φαίνεται ότι το εκχύλισμα ευαισθητοποιεί τα αποκολλημένα καρκινικά κύτταρα A549 στο Ανοίκις έναν ιδιαίτερο τύπο απόπτωσης που παρατηρείται στα αποκολλημένα επιθηλιακά κύτταρα. Μέχρι σήμερα δεν έχει διαπιστωθεί κάποια συγκεκριμένη ουσία που να προκαλεί τα προαναφερόμενα φαινόμενα και να οδηγεί σε επιλεκτική απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Ανάμεσα σε άλλα αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae ενδιαφέρον για την αντικαρκινική του δράση παρουσίασε το αρωματικό φυτό *S. horvatii ssp. macrophylla*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αέριο χρωματογραφικής ανάλυσης (GC-MS) το είδος που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές ανήκει στον χημειότυπο της καρβακρόλης (42-48%). Εικοσιδύο πτητικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά (GC-MS) ως συστατικά του αρωματικού αυτού φυτού. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων διαπιστώθηκε ότι ένα μικρό μέρος των πτητικών συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος (3,41%) που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές περιέχονται στο εκχύλισμα που εφαρμόστηκε στα κύτταρα (GC-MS). Όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα του ελέγχου με μορφολογικά και βιοχημικά κρητήρια το εκχύλισμα που εφαρμόστηκε στα A549 επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα ενεργοποιεί την απόπτωση και προκαλεί νέκρωση σε αυτά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών διαπιστώθηκε, ότι το αιθέριο έλαιο του *S. horvatii ssp. macrophylla* αναστέλει τη μυκηλιακή ανάπτυξη των *B. cinerea*, *A. alternata* που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις στους καρπούς της τομάτας και προσβάλλουν τα φυτά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους καθώς και του *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, το οποίο είναι ένα εδαφογενές φυτοπαθογόνο που προκαλεί αδρομύκωση στα φυτά της τομάτας. Για όλες τις

συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν η δράση του αιθέριου ελαίου ήταν μυκοστατική, ενώ μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η υποκαπνιστική δράση του αιθέριου ελαίου συγκριτικά με την δράση εξ' επαφής. Η περαιτέρω διερεύνηση της φυτοπροστατευτικής δράσης του αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvati* ssp. *macrophylla* και η αξιοποίηση του σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης των φυτοπαρασίτων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Βιβλιογραφία

- Abdel-Massih R.M., Fares R., Bazzi S., El-Chami N. and Baydoun E., 2010. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leukemia Research*, 34, 1052-1056.
- Adorjan B., Buchbauer G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance. Journal* , 25, 407–426.
- Aggarwal B., Takada Y., Oommen O., 2004. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 13, 1327-1338.
- Aggarwal B.B., 2000. Apoptosis and Nuclear Factor-kB: A Tale of Association and Dissociation. *Biochemical Pharmacology*, 60, 1033–1039.
- Ahmad A, Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A., Manzoor N. 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30, 41-50.
- Ahn Y.J., Lee S.B., Lee H.S., Kim G.H., 1998. Insecticidal and Acaricidal Activity of Carvacrol and β -Thujaplicine Derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* Sawdust. *Journal of chemical ecology* 24, 81-90.
- Alberts B., Bray D., Hohnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2000. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Εισαγωγή στη μοριακή βιολογία του κυττάρου. Μετάφραση –Επιμέλεια Ζιούδρου Χ., Ανάγνου Ν., Ζιούδρου Χ. Παπαζαφείρη Π. Παπαματθαϊάκης Ι., Σταματοπούλος Κ., Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 185,420, 558-559.
- Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer JP, Mason TJ, 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics sonochemistry* 11, 261-265.
- Amaral J.D., 2010. The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine*, 9, 145-152.
- Amundson S., Myers T., Fornace A., 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17, 3287 -3299.
- Armstrong J.S. 2006. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*, 6, 225-234.

- Arunasree KM, 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*. 17, 581-8.
- Azizi M. , Farzad S., Jafarpour B., Rastegar M.F., Jahanbakhsh V., 2006. Inhibitory effect of some medical plants' essential oils on postharvest fungal disease of citrus fruits. *ISHS Acta Horticulturae* 768: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on The Role of Postharvest Technology in the Globalisation of Horticulture.
- Baba A.I., 2009. Apoptosis and necrosis. *Lucrări științifice medicină veterinară, Timisoara* . XLII (2), 347-359.
- Baden C. 1991. *Mountain Flora of Greece 2*, University Press, Edinburgh 121-127.
- Badisa, R.B., Tzakou O., Couladis M., Pilarinou E., 2004. Cytotoxic Activities of *Salvia* of the Labiatae Family. *Pharmaceutical Biology*, 42, 640-645.
- Baetu T.M., Hiscott J., 2002. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 199–207.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Balunas M.J. & Kinghorn A. D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431 – 441.
- Bandyopadhyay U., Das D., Banerjee R.K., 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current science* 77, 658-666.
- Barbehenn R.V., Constabel P.C., 2011. Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), pages 1551-65.
- Barbouti A., Amorgianiotis C., Kolettas E., Kanavaros P., Galaris D., 2007. Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 43, 1377-87.
- Bezie N, Scocibusic M., Dunkic V., 2005. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja Montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oils. *Acta botanica Croat* 64, 313-322.

- Bezie N, Smanic I., Dunkie V., Besendorfer V. Puizina J. 2009. Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four south- Croatian *Satureja* species (Lamiaceae). *Molecules* 14, 925-938.
- Bhalla Y., Gupta V. K., Jaitak V. 2013. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 93, 3643–3653.
- Boldingh Debernard K.A., Aziz G, Gjessvik A.T., Paulsen R.E., 2011. Cell death induced by novel procaspase-3 activators can be reduced by growth factors. *Biochemical and Biophysical research communications*, 413, 364-369.
- Bolt H.M. , Hengstler J.G. , Stewart J., 2009. Analysis of reactive oxygen species. *EXCLI Journal* 8, 241-245.
- Bouchra C., Achouri M., Hassani L.M., Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of ethnopharmacology* 89, 165-169.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C., 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22, 8608–8618.
- Brouwer M., de Ley L., Feltkamp C.A., Elema J., Jongsma A.P. M., 1984. Serum-dependent "Cannibalism" and Autodestruction in Cultures of Human Small Cell Carcinoma of the Lung. *Cancer research* 44, 2947-2951.
- Brufau G., Canela M.A., Rafecas M., 2008. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research* 28, 217–225.
- Boulares A. H., Yakovlev A.G., Ivanova V., Stoica B.A., Wang G., Iyer S., Smulson M. 1999. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. Caspase 3 resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cell. *The journal of biological chemistry*, 274, 22932–22940.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

- Calcabrini A., Stringaro A., Toccaceli L., Meschini S., Marra M., Colone M., Salvatore G., Mondello F., Arancia G., Molinari A., 2004. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 122, 349–360.
- Calderón-Montaña J., Burgos-Morón E., Lopez-Lazaro M., 2013 a. The Cardiac Glycosides Digitoxin, Digoxin and Ouabain Induce a Potent Inhibition of Glycolysis in Lung Cancer Cells. Downloaded from <http://www.webmedcentral.com> on 09-Jul-2013,
- Calderón-Montaña J.M., Burgos-Morón E., López-Lázaro M., 2014. The *in vivo* antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Oncogene* 29;33, 2947-2948.
- Calixto J.B., Beirith A., Ferreira J., Santos A.R. S., Filho V.C. and Yunes R. A., 2000. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. Review article. *Phytotherapy Research* 14, 401–418.
- Calvino-Fernández M., Parra-Cid T., 2010. *H. pylori* and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress, 102, 41-50.
- Cassady, J.M., Douros, J.D. (Eds.), 1980. *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*. Academic Press, New York.
- Cavar S., Maksimovic M., Edita Šolic' M., Jerkovic'-Mujkic' A., Bešta R., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry* 111, 648–653.
- Cerella C., Dicato M., Diederich M., 2013. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion* 13, 225–234.
- Cerella C., Dicato M., Diederich M., 2013. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion* 13, 225–234.
- Cetojević-Simin D.D, Canadanović-Brunet J.M. Bogdanović G.M., Cetković G.S., Tumbas V.T., Djilas S.M., 2004. Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of BUON*, 9, 443-449.
- Chinnaiyan A.M., Rourke K.O., Tewari M., Dixit V.M., 1995. FADD, a Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis. *Cell*, 81, 505-512.

- Chinou I., Liolios C., Moreau D., Roussakis C., 2007. Cytotoxic activity of *Origanum dictamnus*. *Fitoterapia*, 78, 342–344.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P., 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture* 2, 228-243.
- Circu M.L., Aw T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 48, 749–762.
- Conus S., Simon H.U. 2008. Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochemical pharmacology* 76, 1374 – 1382.
- Cragg G.M., Newman D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72–79.
- D' Alfonso T. M., Ginter P.S., Salvatore S.P., L.B. Antonio, Hoda S. A., 2013. Phylloides Tumor With Numerous Thanatosomes (“Death Bodies”): A Report of Two Cases and a Study of Thanatosomes in Breast Tumors. *International Journal of Surgical Pathology*, 22, 337.
- Daferera D., Ziogas B.N., Polissiou M.G., 2000. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576–2581.
- Daniel D., Süsal C., Kopp B., Opelz G., Terness P. 2003. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. *International Immunopharmacology* 3, 1791–1801.
- Dardioti A., Hanlidou E., Lanaras T., Kokkini S., 2010. The Essential Oils of the Greek Endemic *Satureja horvatii* ssp. *macrophylla* in Relation to Bioclimate. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 1968-1977.
- de Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano C.S., Gattass C.R., 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 677–681.
- Debatin K.M., Krammer P.H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950–2966.

- DunkiĆ V., Bezić N., Vuko E., Cukrov D., 2010. Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L. ssp. *variegata* (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. *Molecules*, 15, 6713-6721.
- Dunkie V., Kremer D., Dragojevic Muller I. Stabrntheiner E., Kuzmic S., Jurisic Grubescic R., Vujic L. Kosalec I., Randic M., Srecec S., Bezic N. 2012. Chemotaxonomic and Micromorphological Traits of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis (Lamiaceae). *Chemistry and Biodiversity* 9, 2825-2842.
- Edinger A.L., Thompson C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 663–669.
- Edris A.E., 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy. Research*, 21, 308–323.
- Edris AE., Farrag ES., 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung* 47, 117-21.
- El-Dakhkhany M., 1963. Studies on the chemical constitution of Egyptian *N. sativa* L. seeds. *Planta Med* 11, 465–70.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35, 495–516.
- Eminagaoglu O., Tepe B., Yumrutas O., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., 2007. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*, 100, 339—343.
- Fadeel B., Orrenius S., 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease (Review). *Journal of Internal Medicine* 258, 479–517.
- Fais S., 2007. Cannibalism: A way to feed on metastatic tumors. *Cancer Letters*, 258, 155-164.
- Fe Andrés M., González, Coloma A., Sanz J., Burillo J., Sainz P., 2012. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochemistry Reviews*, Volume 11, 371-390.
- Feng W., Chen J., Zheng X., Liu Q., 2011. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22, 78–81.
- Ferdes M., Ungureanu C., 2012. Antimicrobial activity of essential oils against four food – born fungal strains. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 74, 87-98.

- Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, Volume 18, 7719-7730.
- Fleury C., Mignotte B., Vayssière J.L., 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131–141.
- Florey O., Krajcovic M., Sun Q., and Overholtzer M., 2010. Entosis. *Current Biology*, 20, 88-89.
- Foster K.A., Oster C.G., Mayer M.M., Avery M.L., Audus K.L., 1998. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental cell research* 243, 359–366.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H.P., Becker K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 88, 587–605.
- Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F. Genovese S., Curini M., 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from the central Italy. *Chemistry of Natural Compounds* 43, 622-624.
- Frese S., Frese-Schaper M., Andres A.C., Miescher D., Zumkehr B., Schmid R.A. 2006. Cardiac Glycosides Initiate Apo2L/TRAIL-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Up-regulation of Death Receptors 4 and 5. *Cancer Research* 66, 5867-5874.
- Frisch S.M., Francis H., 1994. Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 124, 619-626.
- Frisch S.M., Screaton R.A., 2001. Anoikis mechanism. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 555-562.
- Gali-Muhtasib H., Roessner A., Schneider-Stock R., 2006. Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 1249–1253.
- Ghibelli L., Coppola S., Fanelli C., Rotilio G., Civitareale P., Scovassi A. I., Ciriolo M.R., 1999. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *The FASEB Journal* 13, 2031- 2036.
- Giard DJ; Aaronson SA; Todaro GJ; Arnstein P; Kersey JH; Dosik H, Parks WP, 1973. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417–23.

- Gillham C.M., Reynolds J. Hollywood D., 2007. Predicting the response of localised oesophageal cancer to neo-adjuvant chemoradiation. *World Journal of Surgical Oncology* World Journal of Surgical Oncology 5, 97.
- Gilmore A.P., 2005. Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1473–1477.
- Glamoclija J., Sokovic M., Vukojevic J., Milenkovic I., Griensven L.J.L.D. van. 2006. Chemical composition and antifungal activities of essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Salvia pomifera* ssp. *calycina* (Sm.) Hayek. *Journal of Essential Oil Research* 18, 115 - 117.
- Golstein P., Kroemer G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 37-43.
- Gonçalves M.J. , Cruz M.T. , Cavaleiro C. , Lopes M.C. , Salgueiro L. , 2010. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32, 70-75.
- Gören A.C., Topçu G., Bilsel G., Bilsel M., Wilkinson J.M., Cavanagh H., 2004. Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation, thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 18,189-195.
- Gormez O., Diler O., 2014. In vitro Antifungal activity of essential oils from *Tymbra*, *Origanum*, *Satureja* species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, *Saprolegnia parasitica*. Volume 45, 1196–1201.
- Greca MD. Zarrelli A., 2012. Nutraceuticals and Mediterranean Diet. *Medicinal & Aromatic Plants* 1:e126.
- Grosso C., Oliveira A.C., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., and Palavra A.M. 2009. Antioxidant Activities of the Supercritical and Conventional *Satureja montana* Extracts. *Journal of food science* 74, 713-717.
- Groth-Pedersen L., Jäätelä M., 2013. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Letters* 332, 265–274.
- Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J., 2004. Lysosomes in cell death. First publ. in: *Oncogene* 23, 2881-2890.

- Hajhashemi V., Ghannadi A., Pezeshkian S.K. 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 82, pages 83-87.
- Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.A., Longthornel V.L., A.C. Culhane, Williams G.T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, 236, 1-26.
- Hamburger M., Hostettmann K., 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30, 3864–3874.
- Hanlidou E., Kokkalou E., Kokkini S., 1998. Distribution of taxa with alkaloids and/or related compounds in Vikos-Aoos National Park (NW Greece). *Nordic. Journal of Botany* 19, 27-40.
- Harborne J.B. 1990. Role of secondary metabolites in chemical defense mechanisms in plants. Plant secondary metabolites bioactivity. *Bioactive compounds from plants. Ciba Foundation Symposium* 154, 126-139.
- Hartwell, J.L., 1982. *Plants Used Against Cancer*. Quarterman, Lawrence, MA.
- Harvey A., 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *DDT*, 5, 294-300.
- Hehlgans S., Haase M., Cordes N., 2007. Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775, 163–180.
- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776
- Hes O., Michal M., Sulc M., Kocovd L., Hora M., Yarovd M.R., 1998. Glassy Hyaline Globules in Granular Cell Carcinoma of the Kidney. Chromophobe Cell Carcinoma, and Oncocytoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2, (1), Pages 12-18.
- Higuchi Y. 2003. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 66, 1527–1535.
- Hofseth L.J., 2008. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Letters* 268, 10-30.
- Hussain A.R., Ahmed M., Ahmed S., Manogaran P., Platanius L.C., Alvi S.N., Al-Kuraya K.S., Uddin S., 2011. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radical Biology & Medicine* 50, 978–987.

- Inouye S., Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y., Yamaguchi H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* 43, 17-23.
- Isman M., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19, 603-608.
- Ivanova S., Repnik U., Boji L., Petelin A., Turk V., Turk B., 2008. Chapter Nine Lysosomes in Apoptosis. *Methods in Enzymology*, 442, Pages 183-199.
- Jäättelä M., Candé C., Kroemer G 2004. Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death and Differentiation* 11, 135–136.
- Jafri S.H., Glass J., Shi R., Zhang S., Prince M., Kleiner-Hancock H., 2010. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:87.
- Janssen A., Medema R., 2011. Entosis: aneuploidy by invasion. *Nature Cell Biology* 13, 199-201.
- Jin Z., El-Deiry WS., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4, 139-63.
- Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M., Milos M., 2007. *In Vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21, 259–261.
- Juncker T., Cerella C., Teiten M., H., Morceau F., Schumacher M., Ghelfi J., Gaascht F., Schnekenburger M., Henry E., Dicato M., Diederich M., 2011. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* 81, 13–23.
- Kadoglidou K., Lagopodi A., Karamanoli K., Vokou D., Bardas G.A. Menexes G. Constantinidou H.I.A., 2011. Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. *European journal of plant pathology* 130, 297-309.
- Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.

- Kaliora A.C., Kountouri A.M., 2012. Chemopreventive Activity of Mediterranean Medicinal Plants, Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits, Dr. Alexandros G. Georgakilas (Ed.), InTech, 261-284.
- Kapuscinski J., 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotechnic & Histochemistry, 70, 220-33.
- Karamanoli K., Vokou D., Menkissoglu U. & Constantinidou H.I., 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of mediteranean aromatic plants. Journal of chemical ecology 26, 2035-2048.
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen TA, Paoletti R, et al. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. Mayo Clinic Proceedings 78, 965-78.
- Katz A., Lifshitz Y., Bab-Dinitz E., Kapri-Pardes E., Goldshleger R., Tal D.M., and Karlsh S.J.D.. 2010. Selectivity of Digitalis Glycosides for Isoforms of Human Na,K-ATPase. The journal of biological of biological chemistry 285, 19582–19592.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26, 239-57.
- Kim Y.N., Koo K. H., Sung J.Y., Yun U.J., Kim H., 2012. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for TumorMetastasis. International Journal of Cell Biology, Hindawi Publishing Corporation, pp 11
- Kimberley F.C., Screaton G.R., 2004. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. Cell Research., 14, 359–372.
- Kinghorn A.D., Su B-N., Jang D.S., Chang L.C., Lee D., Gu J.Q., Carcache-Blanco E.J., Pawlus A.D., Lee S.K., Park E.J., Cuendet M., Gills J.J., Bhat K., Park H.-S., Mata-Greenwood E., Song L.L., Jang M., Pezzuto J.M., 2004. Natural Inhibitors of Carcinogenesis. Planta Medica, 70, 691-705.
- Kintzios S., 2000. Sage. The genus *Salvia*. Medicinal and aromatic plants- industrial profiles Harwood academic publishers, 14, 252.
- Kirkegaard T., Jäätelä M. 2009. Lysosomal involvement in cell death and cancer. Biochimica et Biophysica Acta 1793, 746–754.
- Kitanaka C., Kuchino Y., 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. Cell Death and Differentiation, 6, 508 -515.

- Koes R.E., Quattrocchio F., Mol J.D., 1994. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution. *Bio Essays* 16, 123-132.
- Kokkini S., Vokou D., 1989. Carvacrol-rich plants in Greece 1989. *Flavour and Fragrance Journal* 4, 1-7.
- Konkimalla V. B. Efferth T., Anti-Cancer Natural Product Library from Traditional Chinese Medicine 2008. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 11, 7-15.
- Koparal A.T., Zeytinoglu M., 2003. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology* 43, 149-154.
- Koroch A.R., Juliani H.R., Zygodlo J.A. 2007. Bioactivity of Essential Oils and Their Components. *Flavours and Fragrances*, pp 87-115.
- Kostyukovsky m., Rafaeli A, Gileadi C., Demchenko N. & Shaaya E., 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants possible mode of action against insect pests. *Pest management Science*, 58, 1101-1106.
- Krajcovic M, Johnson NB, Sun Q, Normand G, Hoover N, Yao E, Richardson AL, King RW, Cibas ES, Schnitt SJ, Brugge JS, Overholtzer M. 2011. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Natural Cell Biology* 13, 324-330.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri ES., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G.; 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16, 3-11.
- Kruger N.J. 2009. The Bradford Method For Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook Springer Protocols Handbooks*, pp 17-24.
- Kumar S. 2013. Cardiac Glycosides as Anticancer Agent. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 4, 1371-1378.
- Lacusic B., Ristic M., Slavkovska V., Stankovic J., Milenkovic M., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Satureja horvatii* Silc (Lamiaceae). *Journal of the Serbian chemical society* 73, 703-711.

- Laird K., Phillips C., 2011. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? Letters in Applied Microbiology 54, 169–174.
- Lakusic B., Ristic M., Slavkovska V., Milenkovic M., Lakusic D., 2011. Environmental and Seasonal Impacts on the Chemical Composition of *Satureja horvatii* S ilicx (Lamiaceae) Essential Oils. Chemistry & Biodiversity 8 , 483-493.
- Landa P., Kokoska L., Pribylova M., Vanek T., Marsik P., 2009. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. Archives of Pharmacal Research 32, 75-78.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P., 1997 Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. Journal of Experimental medicine 185, 1481–1486.
- Li W.Y., Chan S.W., Guo D.J., Chung M.K., Leung T.Y., Yu P.H., 2009. Water extract of *Rheum officinale* Baill induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 and human breast cancer MCF -7 cell lines. (In press) Journal of ethnopharmacology, 124, 251–256.
- Liang W.Z., Lu C.H., 2012. Carvacrol-induced [Ca²⁺]_i rise and apoptosis in human glioblastoma cells Life Sciences 90, 703–711.
- Lindholm P., Gullbo J., Claeson P., Goransson U., Johansson S., Backlund A., Larsson R., Bohlin L., 2002. Selective Cytotoxicity Evaluation in Anticancer Drug Screening of Fractionated Plant Extracts. Journal of Biomolecular Screening 7, 333-340.
- Ljubuncic P., Azaizeh H., Portnaya I., Cogan U., Said O., Saleh K.A., Bomzon A., 2005. Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel Journal of Ethnopharmacology, 99, 43-47.
- López-Lázaro M., 2007. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. August, 11, 1043-1053.
- Lopez-Reyes J., Spadaro D., Gullino M., Garibaldi A., 2010. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. Flavour and fragrance, 25, 171-177.

- Lopez-Reyes JG, Spadaro D, Prella A, Garibaldi A, Gullino ML 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *Journal of food protection* 76, 631-639.
- Lugini L., Matarrese P., Tinari A., Lozupone F., Federici C., Iessi E., Gentile M., Luciani F., Parmiani G., Rivoltini L., Malorni W., Fais S., 2006. Cannibalism of Live Lymphocytes by Human Metastatic but Not Primary Melanoma Cells. *Cancer Research*, 66, 3629-3638.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Madsen HL, Sorensen B., Skibsted L.H., Bertelsen G. 1998. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chemistry* 63, 173-180.
- Mahmood T., and Yang P.C., 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences (NAJMS)*, 4, 429–434.
- Majno G., Joris I., 1995. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, 146, 3-15.
- Marei G, Rasoul MAA, Abdelgaleil SAM (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pestic Biochem Physiol* 103:56-61.
- Marin M., Novakovic M., Tesevic V. Vuckovic I., Milojevic N., Vukovic Gacic B., Marin P., 2012. Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of essential oil of wild growing *Satureja montana* L. from Dalmatia, Croatia. *Flavour and fragrance journal* , 27, 216-223.
- Marković T., Chatzopoulou P., Šiljegović J., Nikolić M., Glamočlija J., Ćirić A., Soković M. 2011. Chemical Analysis and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63, 457-464.
- Martin K.R., Appel C.L., 2010. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements* 2, 1–12.

- Mastelic J., Jerkovic I. 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry 80, 135-140.
- Matés J.M. , Sánchez-Jiménez F.M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 32, 157-170.
- Matés J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153, 83–104.
- Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F. 2009. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece . Food Chemistry, 115, 679–686.
- Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P., Solary E., Micheau O., 2006. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Molecular Cellular Biology, 26, 7046-7055.
- Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R. Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., 2007. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochimica et Biophysica Acta 1776, 32–57.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts Food Chemistry, 85, 231-237.
- Morishima N, Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y., 2002. An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis. Cytochrome c – independent activation of caspase -9 by caspase -12. The journal of biological chemistry, 277, 34287-34294.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J, Yankner B.A., Yuan J, 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum- specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . Nature 403, 98-103.
- Nematollahi-Mahani S.N., Rezazadeh-Kermani M., Mehrabani M., Nakhaee N., 2007. Cytotoxic Effects of *Teucrium polium* on Some Established Cell Lines. Pharmaceutical Biology, 45, 295-298.
- Newman R.A., Yang P., Pawlus A.D., Block K.I. 2008. Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. Molecular intervention 8, 36-49.

- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research* 1833, 3448-3459.
- Norbury C.J., Zhivotovsky B., 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797–2808.
- Νομικός Α., Μυλωνά Ε., Νακοπούλου Λ., 2006. Απόπτωση, καρκίνος και νέες στοχευμένες θεραπείες. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής* 20, 4-13.
- Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112, 874–879.
- Oliveira T., Carvahlo S., Soares R., Andrade M., Cardoso M., Ramos E., Piccoli R., 2012. Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella –type sausages formulated with different levels of sodium nitrite *Science Technology* 45, 204-212.
- Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meyskens F.L., Valanis B., Williams J.H., Barnhart S., Cherniack M. G., Brodtkin C.A., Hammar S., 1996. Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 1550-1559.
- Overholtzer M., Mailleux A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S., King R., Cibas E., Brugge J., 2007. A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* 131, 966–979.
- Ozkan A., Erdogan A., 2012. A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Natural Product Community* 12, 1557-60.
- Pandey K.B., Rizvi S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2 (5), 270-278.
- Panizzi L., Flaminib G., Cionib P.L., Morelli I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 39, 167- 170.
- Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Brenner DS, Newkirk C, Trump BF, Silverberg SG., 2000. “Thanatosomes”: A Unifying Morphogenetic. Concept for Tumor Hyaline Globules Related to Apoptosis. *Human Pathology*., 31, 1455–1465.
- Patel B., Shah V.R., Bavadekar S.A., 2012. Anti-proliferative effects of carvacrol on human prostate cancer cell line, LNCaP. *The FASEB Journal* 26, 1037.5

- Pennarun B., Meijer A., de Vries E.G.E., Kleibeuker J.H., Kruyt F., de Jong S., 2010. Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805, 123–140.
- Phillips D.A., Kapulnik Y., 1995. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. See comment in PubMed Commons below *Trends in Microbiology*, 3, 58-64.
- Pitarokili D., Couladis M., Petsikos-Panayotarou N., Tzakou O., 2002. Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential Oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6688–6691
- Podolak I. Galanty A., Sobolewska D., 2010. Saponins as cytotoxic agents: *Phytochemistry reviews* 9, 425–474.
- Pongrakhananon V. 2013. Chapter 3: Anticancer Properties of Cardiac Glycosides. Intech, open science, open minds. (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)
- Prassas I., Diamandis E., 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews, drug discovery* 7, 926-935.
- Prassas I., Karagiannis G.S., Batruch I., A. Dimitromanolakis, Datti A., Diamandis E.P., 2011. Digitoxin-Induced Cytotoxicity in Cancer Cells Is Mediated through Distinct Kinase and Interferon Signaling Networks. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 2083-2093.
- Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283, 1–16.
- Radonic A., Milos M., 2003. Chemical Composition and *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L. *Free Radical Research* 37 (6), pages 673-679.
- Raju J., Mehta R., 2009. Chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr Cancer*, 61, 27–35.
- Rao R., Ellerby H.M., Bredesen D.E., 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death and Differentiation* 11, 372–380.
- Rastogi-Richa R.P., Sinha R.P., 2009. Apoptosis: Molecular mechanism and pathogenicity. *EXCLI Journal* 8, 155-181.

- Reddy V.N., Kasahara E., Hiraoka M., LinaL.R., S. Ho Y., 2004. Effects of variation in superoxide dismutases (SOD) on oxidative stress and apoptosis in lens epithelium. *Experimental Eye Research* 79, 859–868.
- Regnault-Rogers C., 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2, 25-34.
- Repnik U., Turk B. 2010. Lysosomal–mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10, 662–669.
- Roh H.S., Lee B.H., Park C.G., 2013. Acaricidal and repellent effects of myrtacean essential oils and their major constituents against *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 16, 245–249.
- Rosselli S., Maggio A., Bruno M., Spadaro V., Formisano C., Irace C., Maffettone C., Mascolo N., 2009. Furostanol Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from *Helleborus bocconeii* ssp. *intermedius*. *Phytotherapy Research* 23, 1243–1249.
- Russo M., Tedesco I., Iacomino G., Palumbo R., Galano G. and Russo G. L. 2005. Dietary Phytochemicals in Chemoprevention of Cancer. *Current Medicinal Chemistry - Immunology, Endocrine and Metabolic Agents*, 5, 61-72.
- Rzepa J., Sajewicz M., Baj T., Gorczyca P., Włodarek M., Główniak K., Waksmundzka-Hajnos M., Kowalska T., 2012. A Comparison of Methodical Approaches to Fingerprinting of the Volatile Fraction from Winter Savory (*Satureja montana*). *Chromatography Research International*, Article ID 596807.
- Sadallah S., Eken C., Schifferli J.A., 2010. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 163, 26–32.
- Saleem M., 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Letters* Volume 285, Issue 2, 28 November 2009, 109–115
- Salganik P.I., 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition* 20, 264-275.

- Samuelsson G., 1996. Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προέλευσης. Εγχειρίδιο φαρμακογνωσίας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 133-135.
- Saraste A. Pulkki K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovascular Research, 45, 528–537.
- Savini I., Arnone R., Catani M.V., Avigliano L., 2009. *Origanum Vulgare* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Caco2 Cells. Nutrition and Cancer, 61, 381-389.
- Schulze-Osthoff 2008. Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation, 4th edition. Roche diagnostics GmbH.
- Sharma N., Dey P., 2010. Cell Cannibalism and Cancer. Diagnostic Cytopathology, 39, 229-233.
- Shetty K. 1997. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. Asia Pacific journal of clinical Nutrition 6, 162-171.
- Shiraishi H., Okamoto H., Yoshimura A., Yoshida H., 2006. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. Journal of Cell Science 119, 3958-3966.
- Siddique HR¹ Saleem M. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. Life Sciences, 88, 285-93.
- Sies H., Stahl W., 2004. Carotenoids and UV Protection. Photochemical & Photobiological Sciences, 3, 749-752.
- Simpson CD¹, Mawji IA, Anyiwe K, Williams MA, Wang X, Venugopal AL, Gronda M, Hurren R, Cheng S, Serra S, Beheshti Zavareh R, Datti A, Wrana JL, Ezzat S, Schimmer AD. 2009. Inhibition of the Sodium Potassium Adenosine Triphosphatase Pump Sensitizes Cancer Cells to Anoikis and Prevents Distant Tumor Formation. Cancer Research. 69, 2739-47.
- Skočibušić M. & Bezie N, 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two Satureja species essential oil. Phytotherapy research 18, 967-970.
- Soković M., Tzakou O., Pitarokili D., Couladis M., 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. Food / Nahrung 46, 317-320.
- Souza E.L. , Stamford T.L.M., Lima E.O. , Trajano V.N., 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control, 18, 409-413.

- Soylu E.M., Kurt Ş., Soylu S., 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143, 183-189.
- Stahl-Biskup E. & F. Saez, 2002. The genus *Thyme*. Medicinal and aromatic plants- industrial profiles, 24, Taylor & Francis, 2, 75.
- Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, von Wright A. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food chem. Toxicol., 37, 813-23.
- Steven A., Lowe J. 1993. Ιστολογία. Μετάφραση – Επιμέλεια Κίττας Χ.. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 10.
- Stochmal A., Perrone A., Piacente S., Oleszek W., 2010. Saponins in aerial parts of *Helleborus viridis* L.. Phytochemistry Letters 3, 129–132.
- Stryer L. 1991, Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ 46-47
- Svoboda K. P., Hampson J. B., 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. In: Speciality Chemicals for 21st Century. ADME/JENICA, Int Seminar, 16-17 September, ADME, Paris.
- Szegezdi E., Fitzgerald U., Ann N.Y. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. New York Academy of Science 1010, 186-94.
- Tabas I., Ron D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Nat Cell Biol. 13, 184-90.
- Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T., Chiarugi P., 2012. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. Journal of Pathology, 226, 380–393.
- Tait S.W.G., Green D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Molecular Cell Biology 11, 621-632.
- Tardy C., Codogno P., Autefage H., Levade T., Andrieu-Abadie N., 2006. Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). Biochimica et Biophysica Acta, 1765, 101–125.
- Thakur M., Melzig M.F., Fuchs H., Weng A., 2011. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. Botanics: Targets and Therapy 1, 19–29.

- Trenti A., Grumati P., Cusinato F., Orso G., Bonaldo P., Trevisi L., 2014. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2 . *Biochemical Pharmacology* 89, 197–209.
- Turk B., Turk V., 2009. Lysosomes as "Suicide Bags" in Cell Death: Myth or Reality? *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21783-217.
- Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H. Walters S.M., Webb D.A. 1993. *Flora Europaea*. Vol. 1: Psilotaceae to Platanaceae. Cambridge University Press, Cambridge, 249–251.
- Tworowski T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Science. Physiology, chemistry and biochemistry*, 50, 425-431.
- Vagionas K., Graikou K., Ngassapa O., Runyoro D., Chinou I. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 103, 319-324.
- Valentijn A.J., Zouq N., Gilmore A.P., 2003. Anokis. *Molecular Environment of Integrins* 32, 421-424.
- Van Der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R., 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11, 607–628.
- Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S., Schutte B., Reutelingsperger C.P.M., 1998. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 31, 1–9.
- Van Engeland M., Ramaekers F., Schutte B., Reutelingsperger Ch., 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139.
- Van Nimwegen M.J., van de Water B., 2007. Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 73, 597-609
- Veldhuizen E.J. A., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L.M., Zweijter C., Burt S.A., and Haagsman H.P. 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1874–1879.

- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.
- Vitoratos A., Bilalis D., Karkanis A. , Efthimiadou A, 2013. Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not Bot Horti Agrobi*, , 41, 86-92.
- Vokou D. & Liotiri S., 1999. Stimulation of soil microbial activity by essential oils. *Chemoecology*, 9, 41-45
- Vokou D., Katradi K., Kokkini S., 1993. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 187- 196.
- Wahle K.W., Brown I., Rotondo D., Heys S.D., 2010. Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology* 698, 36-51.
- Wang L., Weller C., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.
- Wang W., Li N., Luo M., Zu Y., Efferth T. 2012. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. *Food Chemistry* 115, 679–686.
- Webster M., Witkin K.L. Cohen-Fix O., 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly *Journal of Cell Science* 122 , 1477-1484.
- Winnicka K., Bielawski K., Bielawska A., 2006. Cardiac glycoside in cancer research and cancer therapy. *Analysis* 63, 109-115.
- Wong R., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30, 87.
- Woo C.C., Kumar A.P., Sethi G., Tan K.H., 2012. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology* 83, 443–451.
- Wu C.S., Chen Y.J., Chen J.J.W., Shieh J.J., Huang C.H, Lin P.S., Chang G.C., Chang J.H.T., Lin C.C., 2012. Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo.

- Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume, Article ID 818261, 13 pages
- Wu M., Ding H.F., Fisher D.E., 2001. Apoptosis: Molecular Mechanisms. Encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group / www.els.net.
- Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–306.
- Xavier CP, Lima CF., Fernandes-Ferreira M., Pereira – Wilson C., 2009. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and *rosmarinic acid* induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and cancer* 61, 564-71.
- Yang Y.Q., Li J.C., 2012. Progress of Research in Cell-in-Cell Phenomena. *The anatomical record*, 295, 372-377.
- Yanishlieva N. V., Marinovaa E.M., Gordonb M.H., Raneva V.G., 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64, 59-66.
- Yong-Nyun Kim, Kyung Hee Koo, Jee Young Sung, Un-Jung Yun, and Hyeryeong Kim. 2011. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Cell Biology, Article ID 306879, 11 pages.
- Yuan J., Kroemer G. 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development*, 24, 2592–2602.
- Zong W.X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q.C., Yuan J., Thompson C.B., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 162, 59–69.
- Αγγελοπούλου & Κυριαζόγλου 2002. Εργαστηριακές τεχνικές. Τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμένου DNA. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 19, 167-178.
- Ανδρίκουλα Μ., Βαρθολομάτος Γ., 2001. Απόπτωση. Ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για ζωή. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2001, 18, 496-513
- Βαλαβανίδης 2003. Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί καρκινογένεσης. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών και οξειδωτικών ενώσεων στην έναρξη και προαγωγή κακοήθων νεοπλασιών στον άνθρωπο. Εκδόσεις Βήτα medical Arts, Αθήνα.

- Γεωργάτσος Ι., Κυριακίδης Δ., Γιουψάνης Τ., Χολή-Παπαδοπούλου Θ., Γιαννακούρος Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Α., Κοτίνης Κ., Καράγιωργας Α., Ασβεστά Σ., 2004. Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ 30.
- Γριβέας Ι., Πασαδάκης Π., Παπαγαλάνης Ν., 2012. Σηματοδοτικοί οδοί της ενδογενούς ουαμπαΐνης και νατριούρηση. Ελληνική Νεφρολογία 24 (3), 167-173.
- Δαρδιώτη Α. 2005. Βιοσυστηματική μελέτη της ομάδας *Satureja montana* L. στην Ελλάδα. Διδακτορική διατριβή, τμήμα Βιολογίας, τομέας Βοτανικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σελ 151, 206
- Καββαδάς Δ. 1934. Εικονογραφημένο Βοτανικό και φυτολογικό λεξικό. Αθήνα ,Τόμος ΙΙΙ, σελ. 1424-1426.
- Καράταγλης Σ., 1999. Φυσιολογία φυτών. Εκδόσεις Art of text, Θεσσαλονίκη. Σελ. 363-368, 373-378, 390-391.
- Κωφίδης Γ., 2004. Εποχιακές μεταβολές στη δομή, φωτοσύνθεση και τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών κατά την υψομετρική διαβάθμιση του Παγκαίου. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Μαλούπα Ε. 2012. Ελληνική Χλωρίδα: Διατήρηση και Αξιοποίηση των Αρωματικών -Φαρμακευτικών Ειδών. Εργαστήριο Προστασίας και Αξιοποίησης Αυτοφυών και Ανθοκομικών Ειδών, Κέντρο Γεωργικής Έρευνας Βόρειας Ελλάδας, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Θέρμη, Θεσσαλονίκη.
- Μοναστηριώτη Μ., 2003. Ο ρόλος του νευροδιαβιβαστή / νευρορμόνη Οκτοπαμίνη στον έλεγχο Ωοαπόθεσης των εντόμων. 10^ο Πανελλήνιο Εντομολογικό συνέδριο, Ηράκλειο, Περιλήψεις.
- Μπούρμπος Β., Σκουντριδάκης Μ. Δαράκης Γ., 1997. Τα φυτικά αιθέρια έλαια στην αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών. Φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά. Ζ' τριήμερο εργασίας. Πολιτιστικό Τεχνολογικό Ίδρυμα ΕΤΒΑ, Κύπρος. Σελ. 496-506
- Νικολοπούλου Α., Μιχαλοπούλου Λ., 1997. Απόπτωση, Καρκίνος και θεραπεία. Παθολογικό ανατομείο Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών. Αρχεία παθολογικής ανατομικής 11, 4-13.
- Πολυσίου Μ., 2002. Επενδυτικές δυνατότητες στον τομέα των αρωματικών φυτών στην Ελλάδα. Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών & Υπουργείο Γεωργίας, Αθήνα.

Σκρούμπης Β.,1985. Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη. Σελ. 14-24.

Σκρούμπης Β.,1998. Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας. Αγροτύπος. Σελ. 23-28.

Τζωρτζάτου Σταθοπούλου Φ., 2007. Η ζωή και ο θάνατος των κυττάρων στους ιστούς. Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση, 325-345.

Υφαντή Π., 2006. Επίδραση αιθέριου ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* (L.) στην αφίδα των χρυσανθέμων *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette). Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Αγροχημεία - Βιολογικές καλλιέργειες, Ιωάννινα.

Διαδουκτιακές πηγές

www2.nsysu.edu.tw/MR/teacher/DuPR01.pdf

www.eurocytology.eu

<http://cbm.msoe.edu/scienceOlympiad/module2012/apoptosis.html>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Αντιπροσωπευτικοί πίνακες αναφορικά με τα αποτελέσματα της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης (GC-MS) των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές, έπειτα από σύγκριση των φασμάτων μάζας των διαχωρισμένων συστατικών με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης Nist MS Search 2.0.

Πίνακας 16: Στο πίνακα αναφέρονται τα συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του αρωματικού φυτού *O. vulgare* srr *hirtum*, οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας (%) των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητας B	Βασικό ιόν m/z	Ποσοστό %
1	6.1	a-Thujene	C10H16	90.4	94.1	93	1.19
2	6.35	a-Pinene	C10H16	90.1	92.9	93	0.62
3	6.88	Camphene	C10H16	88.7	95.8	93	0.14
4	7.76	1-Octen-3-ol	C8H16O	80.3	83.5	57	0.71
5	7.98	Myrcene	C10H16	83.5	86.4	93	1.68
6	8.31	3-Octanol	C8H18O	85.7	90.5	59	0.04
7	8.67	a-Phellandrene	C10H16	91.2	94.5	93	0.42
8	9.04	a-Terpinene	C10H16	85.9	92.5	93	1.63
9	9.39	p-Cymene	C10H14	89.5	92.3	119	5.4
10	9.5	Limonene	C10H16	89.5	93.9	68	0.3
11	9.6	b-Phellandrene	C10H16	87.9	92.7	93	0.42
12	10.05	cis Ocimene	C10H16	82.9	87.8	93	0.06
13	10.61	g-Terpinene	C10H16	88.8	93.7	93	5.27
14	11.14	άγνωστο	C10H18O			93	0.94
15	11.66	Terpinolene	C10H16	87.2	94.0	93	0.08
16	12.25	Linalool	C10H18O	79.8	85.8	71	0.05
17	15.54	Borneol	C10H18O	84.3	92.3	95	0.55
18	15.85	Terpinene-4-ol	C10H18O	89.8	91.9	71	0.62
19	16.54	a-Terpineol	C10H18O	81.5	91.8	59	0.17
20	16.74	Dihydrocarvone	C10H16O	74.8	85.5	67	0.07
21	18.39	Thymol methyl ether	C11H16O	79.3	92.7	149	0.02
22	21.91	Thymol	C10H14O	86.5	88.8	135	12.17
23	22.79	Carvacrol	C10H14O	85.6	91.5	135	63.99
24	30.93	Eugenol methyl ether	C11H14O2	82.1	93.5	178	0.08
25	31.39	Caryophyllene	C15H24	90.2	90.8	93	1.92
26	32.72	Aromadendrene	C15H24	78.9	86.2	91	0.01
27	33.86	a-Humulene	C15H24	89.4	94.5	93	0.25
28	37.09	b-Bisabolene	C15H24	88.0	90.5	69	0.8
29	37.67	d-Cadinene	C15H24	72.9	869	119	0.01
30	40.64	Spathulenol	C15H24O	84.4	916	91	0.1
31	40.76	Caryophyllene oxide	C15H24O	86.6	882	79	0.3

Πίνακας 17: Στο πίνακα αναφέρονται τα συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*, (αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό), οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητας B	Βασικό ión m/z	Ποσοστό %
1	6.08	a-Thujene	C10H16	89.9	95.2	93	1.31
2	6.33	a-Pinene	C10H16	89.2	93.1	93	1.43
3	6.86	Camphene	C10H16	87.9	95.8	93	1.86
4	7.52	Sabinene	C10H16	73.1	82.7	93	0.01
5	7.74	1-Octen-3-ol	C8H16O	83.0	85.1	57	1.75
6	7.95	ά-Myrcene	C10H16	85.3	88.0	93	1.05
7	8.29	3-Octanol	C8H18O	86.9	90.3	59	0.1
8	8.65	à-Phellandrene	C10H16	81.7	86.0	93	0.22
9	8.70	d 3-carene	C10H16	87.3	92.5	93	0.08
10	9.01	a-Terpinene	C10H16	86.0	93.3	93	1.62
11	9.15	o-Cymene	C10H14	73.8	92.0	119	0.01
12	9.40	p-Cymene	C10H14	85.1	92.2	119	11.09
13	9.48	Limonene	C10H16	88.4	93.5	68	0.65
14	9.62	Eucalyptol	C10H18O	84.9	85.5	93	1.35
15	10.03	cis-Ocimene	C10H16	72.9	88.1	93	0.02
16	10.59	g-Terpinene	C10H16	88.4	94.3	93	5.35
17	11.12	άγνωστο	C10H18O			93	0.97
18	11.64	Terpinolene	C10H16	88.0	94.4	93	0.16
19	12.23	Linalool	C10H18O	86.9	87.2	71	1.55
20	14.15	Pinocarveol	C10H16O	73.2	81.8	91	0.07
21	14.33	cis-Verbenol	C10H16O	79.0	82.0	91	0.08
22	14.51	Camphor	C10H16O	85.3	95.9	95	0.07
23	15.54	Borneol	C10H18O	88.8	91.8	95	5.22
24	15.83	Terpinene-4-ol	C10H18O	89.6	91.6	71	1.17
25	16.22	p-Cymen-8-ol	C10H14O	84.3	86.2	135	0.23
26	16.52	a-Terpineol	C10H18O	87.9	94.0	59	0.27
27	16.72	Dihydrocarvone	C10H16O	83.8	91.0	67	0.08
28	18.39	Thymol methyl ether	C11H16O	83.3	89.5	149	3.05
29	19.38	Thymoquinone	C10H12O	81.2	87.5	121	0.22
30	21.82	Thymol	C10H14O	86.2	89.2	135	5.48
31	22.65	Carvacrol	C10H14O	85.8	90.7	135	43.81
32	30.37	a-Gurjunene	C15H24	79.8	92.2	105	0.05
33	31.39	Caryophyllene	C15H24	90.8	91.3	93	4.21
34	32.70	Aromadendrene	C15H24	87.5	90.5	91	0.49
35	33.85	a-Humulene	C15H24	87.4	93.6	93	0.16
36	34.11	Alloaromadendrene	C15H24	74.3	87.0	91	0.03
37	35.13	g-Murolene	C15H24	82.0	90.2	105	0.08
38	35.47	Germacrene D	C15H24	72.1	82.4	105	0.02
39	36.05	Viridiflorene	C15H24	84.9	86.0	107	0.23
40	36.34	g-Elemene	C15H24	83.4	89.3	121	0.22
41	37.08	b-Bisabolene	C15H24	89.3	91.7	69	1.29
42	37.38	g-Cadinene	C15H24	78.9	90.6	105	0.08
43	37.65	d-Cadinene	C15H24	86.2	93.7	119	0.16
44	40.64	(-)-Spathulenol	C15H24O	88.1	89.0	91	0.73
45	40.76	Carvophyllene oxide	C15H24O	88.0	89.4	79	1.72
46	40.87	Viridiflorol	C15H24	81.5	82.0	105	0.15
47	41.94	(+)-Epi-bicvclosesquiphellandrene	C15H24	71.7	77.5	161	0.01
48	42.47	a-Bisabolol	C15H26O	740	76.7	109	0.03

Πίνακας 18: Στο πίνακα αναφέρονται τα συστατικά που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*, (λαιοφιλοποιημένο φυτικό υλικό), οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητας B	Βασικό ión m/z	Ποσοστό %
1	6.08	a-Thujene	C10H16	89.6	93.0	93	0.72
2	6.33	a-Pinene	C10H16	88.3	90.4	93	0.74
3	6.86	Camphene	C10H16	90.0	93.2	93	1.18
4	7.74	1-Octen-3-ol	C8H16O	86.2	87.3	57	1.65
5	7.95	α-Myrcene	C10H16	86.6	87.5	93	0.9
6	8.29	3-Octanol	C8H18O	84.2	89.0	59	0.07
7	8.65	à-Phellandrene	C10H16	80.1	83.9	93	0.06
8	9.01	a-Terpinene	C10H16	88.0	91.1	93	1.07
9	9.15	o-Cymene	C10H14	71.3	75.6	119	0.01
10	9.40	p-Cymene	C10H14	76.5	90.5	119	14.24
11	9.48	Limonene	C10H16	90.0	93.7	68	0.38
12	9.62	Eucalyptol	C10H18O	84.7	85.1	93	0.95
13	10.03	cis-Ocimene	C10H16	76.4	87.0	93	0.04
14	10.59	g-Terpinene	C10H16	87.9	90.8	93	5.85
15	11.12	άγνωστο	C10H18O			93	0.88
16	11.64	Terpinolene	C10H16	81.1	92.8	93	0.07
17	12.23	Linalool	C10H18O	88.5	88.6	71	1.75
18	14.15	Pinocarveol	C10H16O	70.0	83.6	91	0.03
19	14.33	cis-Verbenol	C10H16O	75.4	83.4	91	0.06
20	14.51	Camphor	C10H16O	83.1	94.6	95	0.07
21	15.54	Borneol	C10H18O	88.7	89.8	95	5.64
22	15.83	Terpinene-4-ol	C10H18O	88.8	90.3	71	0.87
23	16.22	p-Cymen-8-ol	C10H14O	84.9	86.8	135	0.18
24	16.52	a-Terpineol	C10H18O	88.2	92.4	59	0.16
25	16.72	Dihydrocarvone	C10H16O	80.4	89.3	67	0.04
26	18.39	Thymol methyl	C11H16O	89.3	89.7	149	0.67
27	19.38	Thymoquinone	C10H12O2	74.2	80.4	121	0.01
28	21.82	Thymol	C10H14O	90.2	91.9	135	2.33
29	22.65	Carvacrol	C10H14O	88.4	89.4	135	50.04
30	31.39	Caryophyllene	C15H24	89.7	90.2	93	4.53
31	32.70	Aromadendrene	C15H24	80.6	88.3	91	0.17
32	33.85	a-Humulene	C15H24	79.8	82.9	93	0.05
33	35.13	g-Muurolene	C15H24	71.5	78.0	105	0.01
34	35.47	Germacrene D	C15H24	73.9	87.9	105	0.02
35	36.05	Viridiflorene	C15H24	75.2	85.3	107	0.07
36	36.34	g-Elemene	C15H24	811	87.4	121	0.17
37	37.08	b-Bisabolene	C15H24	88.7	89.9	69	1.28
38	37.38	g-Cadinene	C15H24	74.3	87.0	105	0.01
39	37.65	d-Cadinene	C15H24	75.3	88.4	119	0.05
40	40.64	(-)-Spathulenol	C15H24O	88.4	89.0	91	0.56
41	40.76	Caryophyllene oxide	C15H24O	87.8	88.7	79	2.31
42	40.87	Viridiflorol	C15H24	78.4	86.4	91	0.08
43	42.47	a-Bisabolol	C15H26O	78.6	91.6	69	0.02

Πίνακας 19: Στο πίνακα αναφέρονται τα πτητικά συστατικά που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα του *S. horvatii* ssp. *macrophylla*, οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητας B	Βασικό ión m/z	Ποσοστό %
1	6.00	α -Thujene	C10H16	93.8	95.2	93	0.9
2	6.24	α -Pinene	C10H16	92.8	92.8	93	0.95
3	6.78	Camphene	C10H16	92.3	93.5	93	1.22
6	7.69	1-Octen-3-ol	C8H16O	87.6	88.0	57	1.42
7	7.9.0	α -Myrcene	C10H16	90.6	90.7	93	1.12
8	8.23	3-Octanol	C8H18O	88.2	91.5	59	0.07
9	8.59	α -Phellandrene + δ 3-Carene	C10H16			93	0.15
10	8.95	α -Terpinene	C10H16	88.3	89.4	93	0.5
11	9.29	p-Cymene	C10H14	90.0	90.3	119	21.98
12	9.40	Limonene	C10H16	92.2	92.3	68	0.43
13	9.55	1,8-Cineole	C10H18O	87.9	88.0	93	1.03
14	9.95	cis-Ocimene	C10H16	77.8	89.3	93	0.02
15	10.49	γ -Terpinene	C10H16	90.2	90.2	93	7.79
16	11.03	άγνωστο				93	1.11
17	11.55	Terpinolene	C10H16	74.4	87.3	93	0.04
18	12.14	Linalool	C10H18O	90.4	90.5	71	0.87
19	14.04	trans-Pinocarveol	C10H16O	68.6	84.9	55	0.03
20	14.23	cis-Verbenol	C10H16O	78.4	82.6	91	0.04
21	14.40	Camphor	C10H16O	84.1	93.8	95	0.05
22	15.40	Borneol	C10H18O	91.4	92.1	95	3.8
23	15.71	Terpinene-4-ol	C10H18O	90.6	92.2	71	0.32
24	16.11	p-Cymen-8-ol	C10H14O	85.4	95.1	135	0.09
25	16.40	α -Terpineol	C10H18O	85.0	92.3	59	0.1
26	16.60	Dihydrocarvone	C10H16O	80.8	91.1	67	0.05
27	18.24	Thymol methyl ether	C11H16O	91.6	91.9	149	1.33
28	19.21	Thymoquinone	C10H12O2	94.2	94.3	164	2.93
29	21.58	Thymol	C10H14O	91.3	92.4	135	2.01
30	22.20	Carvacrol	C10H14O	89.8	90.5	135	43.2
31	31.15	Caryophyllene	C15H24	92.6	92.8	93	3.75
32	32.49	Aromadendrene	C15H24	86.5	91.5	91	0.22
33	33.63	α -Humulene	C15H24	81.1	90.1	93	0.15
34	33.91	Alloaromadendrene	C15H24	72.4	82.8	91	0.04
35	35.27	γ -Muurolene	C15H24	75.0	86.7	161	0.05
36	35.85	Viridiflorene	C15H24	71.7	83.9	107	0.05
37	36.14	γ -Elemene	C15H24	82.4	92.3	121	0.13
38	36.89	b-Bisabolene	C15H24	92.9	93.7	69	0.93
39	37.18	γ -Cadinene	C15H24	76.3	82.7	161	0.04
40	37.45	δ -Cadinene	C15H24	78.1	83.7	161	0.06
41	40.52	(-)-Spathulenol	C15H24O	88.3	89.6	91	0.22
42	40.64	Caryophyllene oxide	C15H24O	90.6	91.5	79	0.79
43	40.76	Viridiflorol	C15H24	79.8	83.1	107	0.02

Πίνακας 20: Στο πίνακα αναφέρονται τα πτητικά συστατικά που περιέχονται στο εκχύλισμα εφαρμογής του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla*, οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

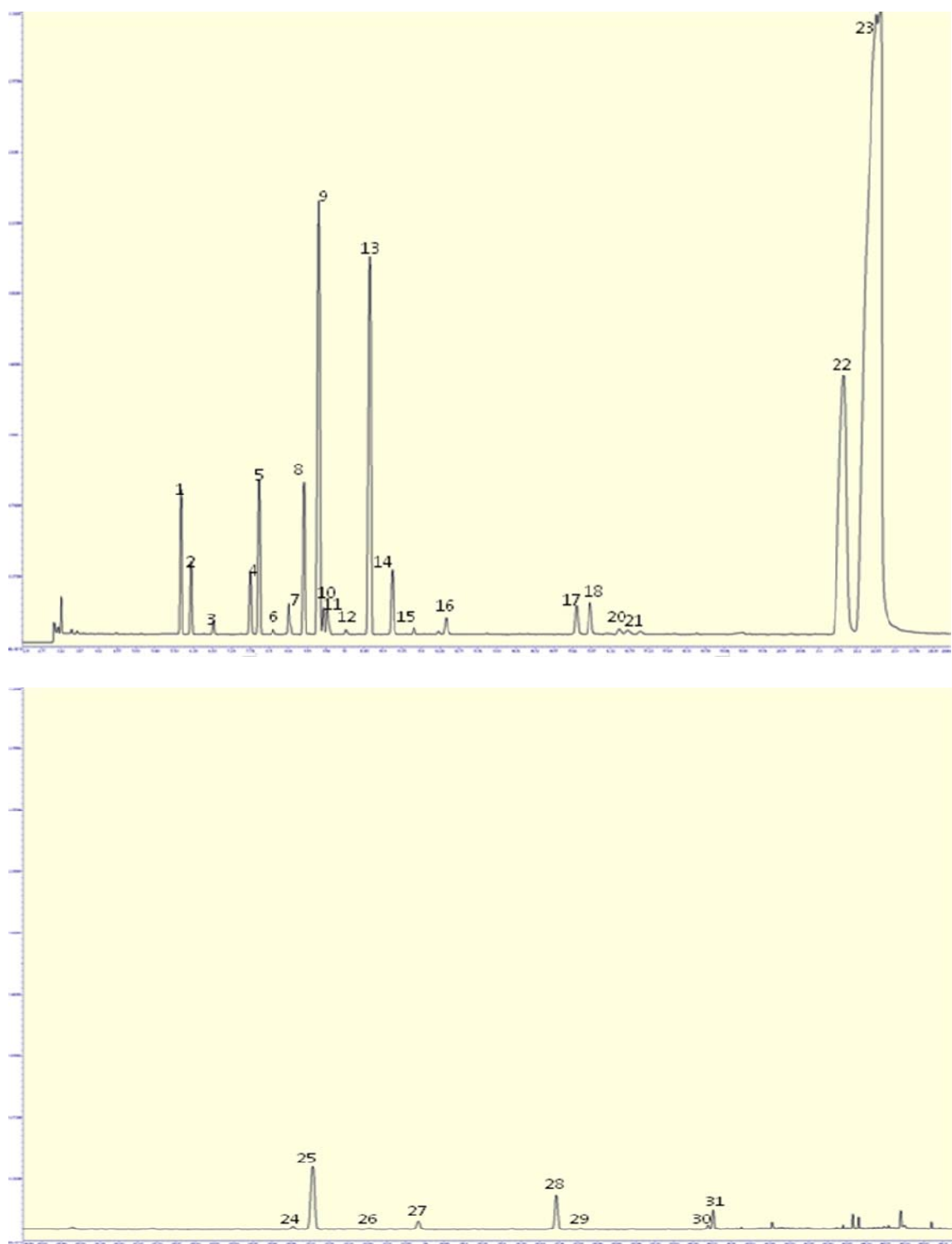
A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητα B	Βασικό ión m/z	Ποσοστό %
1	7.69	1-Octen-3-ol	C8H16O	81.1	91.1	57	0.03
2	9.29	p-Cymene	C10H14	77.1	88.6	119	0.03
3	10.49	γ-Terpinene	C10H16	74.8	79.7	93	0.01
4	11.03	άγνωστο				93	0.02
5	12.14	Linalool	C10H18O	78.6	88.4	71	0.02
6	15.40	Borneol	C10H18O	90.6	91.2	95	0.17
7	15.71	Terpinene-4-ol	C10H18O	75.0	86.5	71	0.02
8	16.11	p-Cymen-8-ol	C10H14O	78.9	72.9	135	0.02
9	16.40	α-Terpineol	C10H18O	74.3	77.5	59	0.02
10	19.21	Thymoquinone	C10H12O2	84.6	87.8	164	0.17
11	21.58	Thymol	C10H14O	80.6	89.9	135	0.06
12	22.20	Carvacrol	C10H14O	92.7	92.8	135	2.87

Πίνακας 21: Στο πίνακα αναφέρονται τα πτητικά συστατικά του αρωματικού φυτού *S. horvatii* ssp. *macrophylla* που μεταβαίνουν σε αέρια κατάσταση και ανιχνεύονται έπειτα από επώαση στους 40 °C, οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης, ο χημικός τους τύπος, η μάζα προς το φορτίο (m/z) του βασικού ιόντος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό, ο βαθμός συμβατότητας των φασμάτων μάζας με τα φάσματα μάζας της βιβλιοθήκης φασμάτων (A) και το αντίστροφο (B) (Nist MS Search 2.0), καθώς και η εκατοστιαία συνεισφορά του (%) στο σύνολο των ταυτοποιημένων συστατικών.

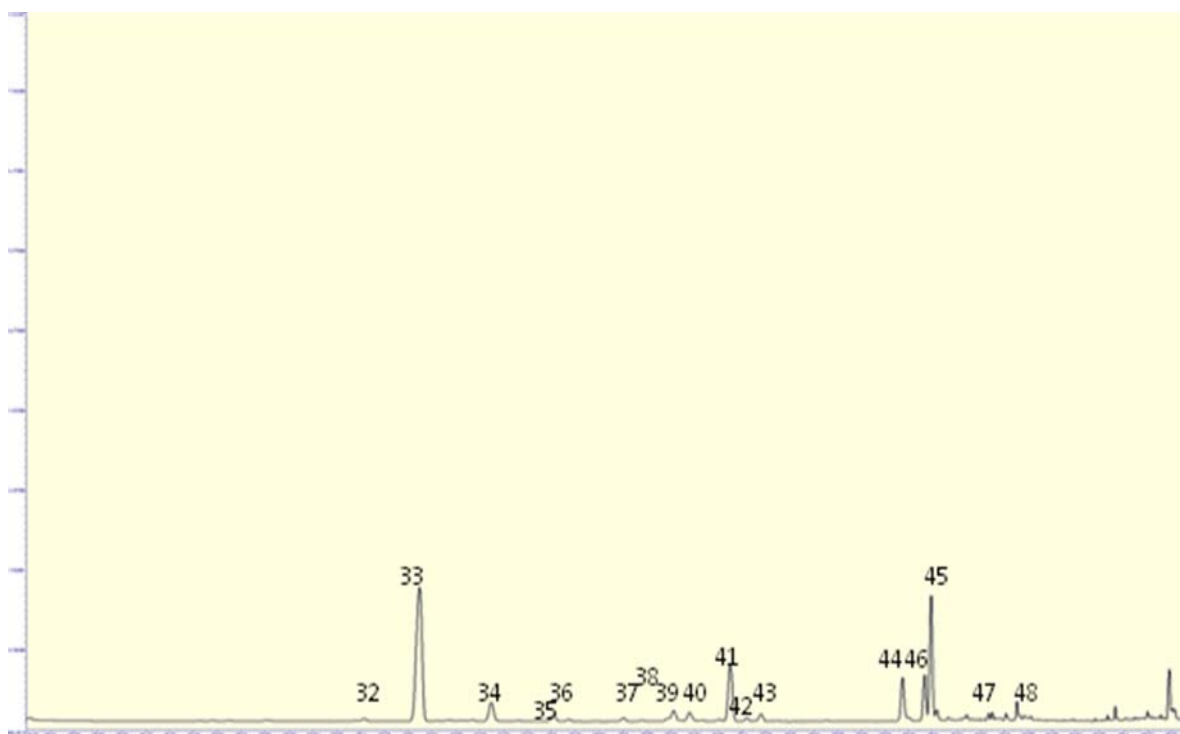
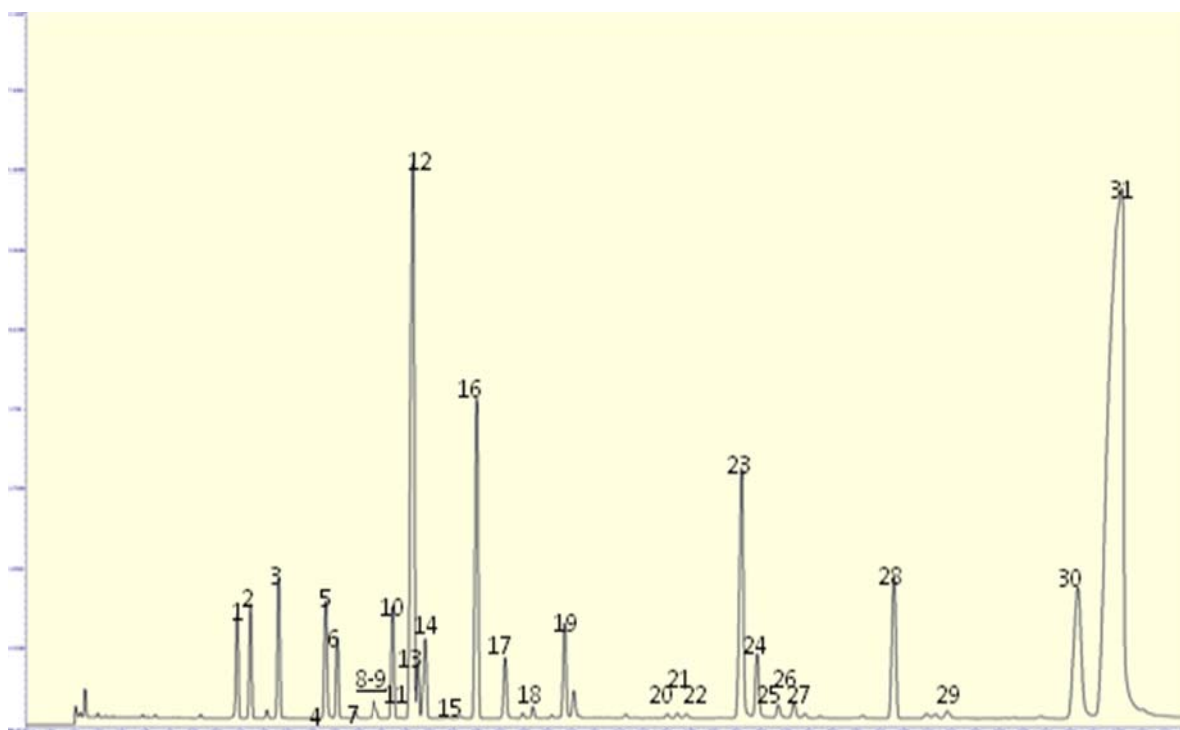
A/A	R.T. (min)	Συστατικό	Χημικός τύπος	Βαθμός συμβατότητας A	Βαθμός συμβατότητα B	Βασικό ión m/z	Ποσοστό %
1	6.31	α -Thujene	C10H16	89.8	92.3	93	5.24
2	6.55	α -Pinene	C10H16	914	92.5	93	5.25
3	7.07	Camphene	C10H16	899	93.4	93	5.47
4	7.73	Sabinene	C10H16	77.2	81.2	93	0.11
5	7.92	β -Pinene	C10H16	91.4	92.4	93	1.19
6	8.16	α -Myrcene	C10H16	81.3	83.1	93	7.26
7	8.87	α -Phellandrene + δ 3-Carene	C10H16	88.1	90.3	93	1.19
8	9.57	p-Cymene	C10H14	87.7	89.0	119	39.65
9	9.80	1,8-Cineole	C10H18O	80.3	82.6	93	5.23
10	10.75	γ -Terpinene	C10H16	86.9	88.0	93	22.02
11	11.41	άγνωστο				93	0.03
12	11.81	Terpinolene	C10H16	73.6	89.3	93	0.05
13	12.47	Linalool	C10H18O	70.1	79.0	93	0.09
14	18.48	Thymol methyl ether	C11H16O	85.0	86.5	149	2.17

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

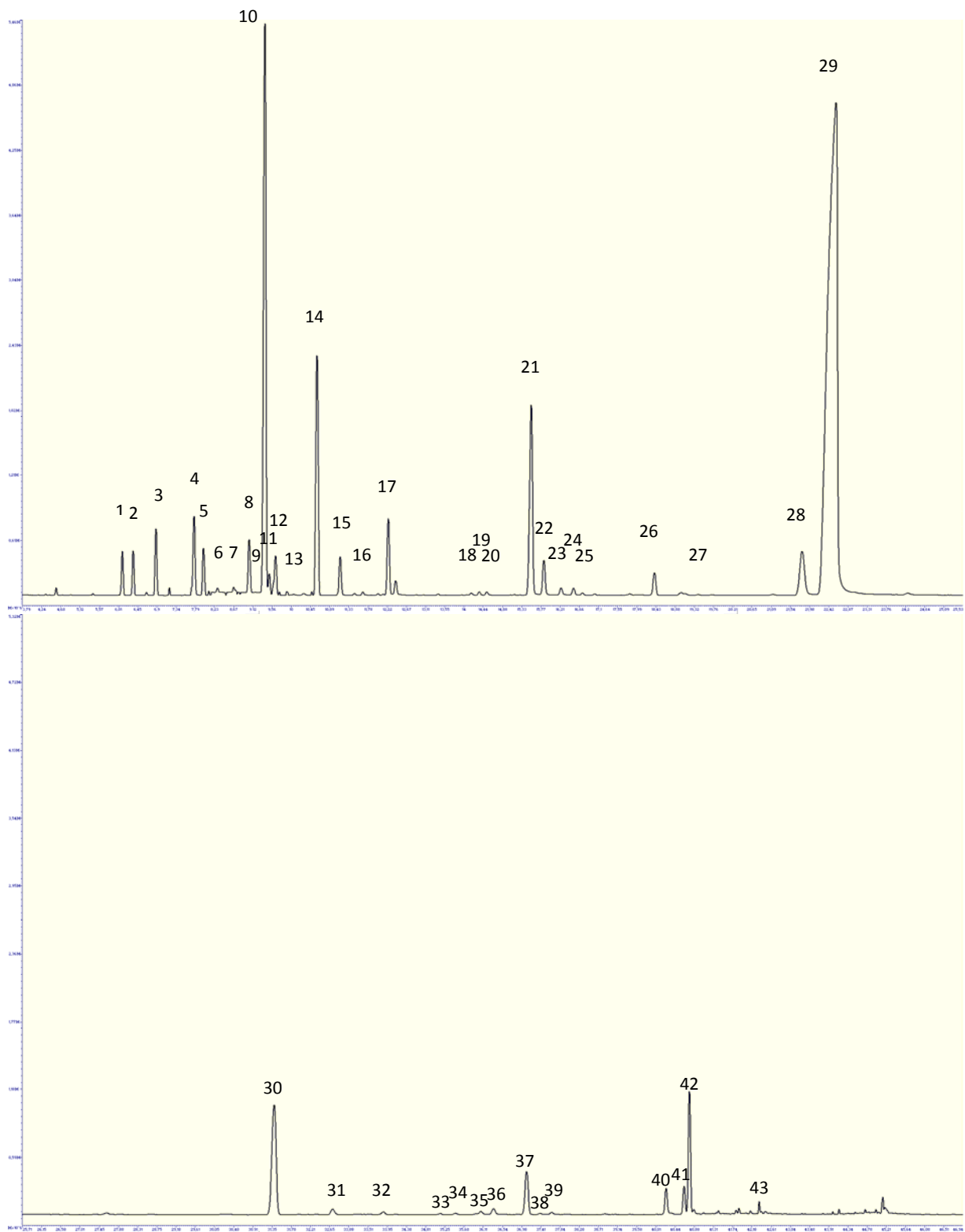
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα (GC-MS) των αιθέριων ελαίων και των επιλεγμένων
εκχυλισμάτων



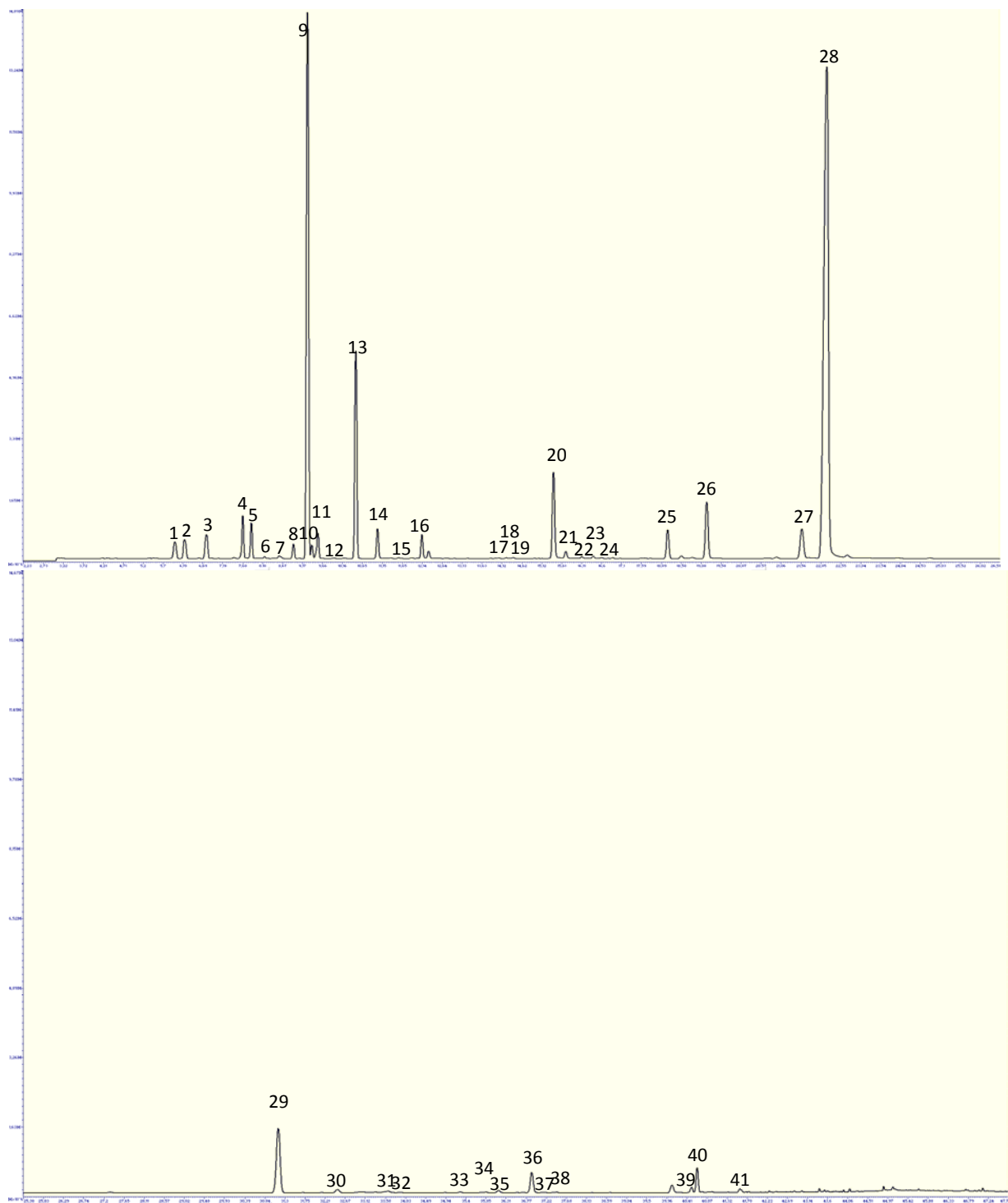
Χρωματογράφημα 1: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *O. vulgare* ssp. *hirtum* (αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 16.



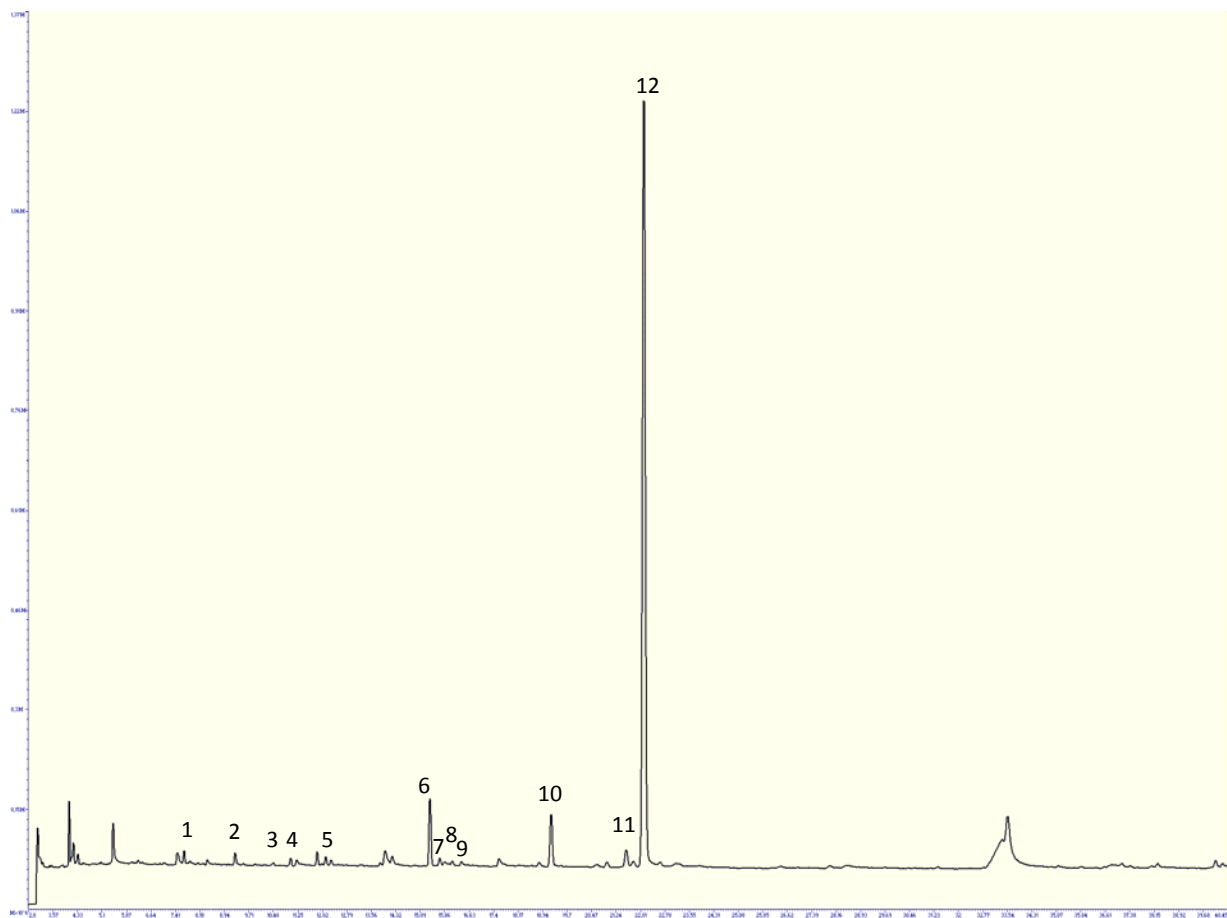
Χρωματογράφημα 2: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla* (αποξηραμένο σε κανονικές συνθήκες φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 17.



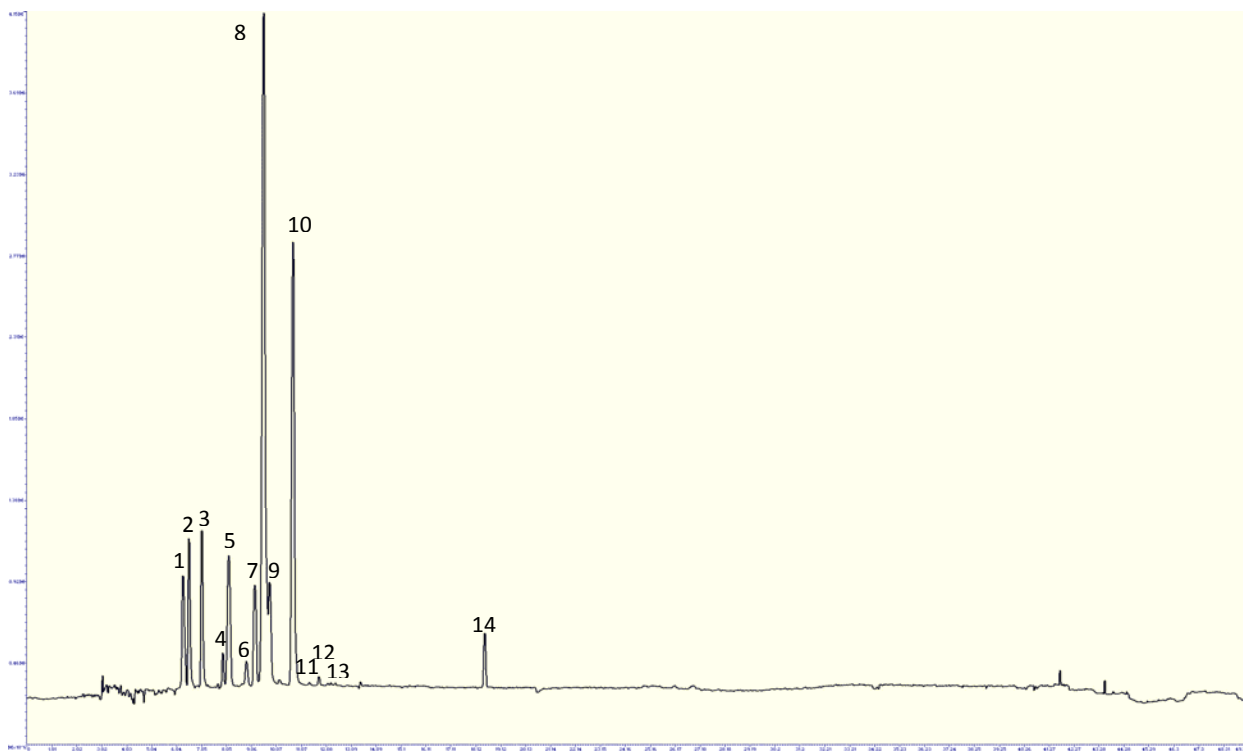
Χρωματογράφημα 3: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla* (Λυοφιλοποιημένο φυτικό υλικό). Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 18.



Χρωματογράφημα 4: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα MeOH εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 19.



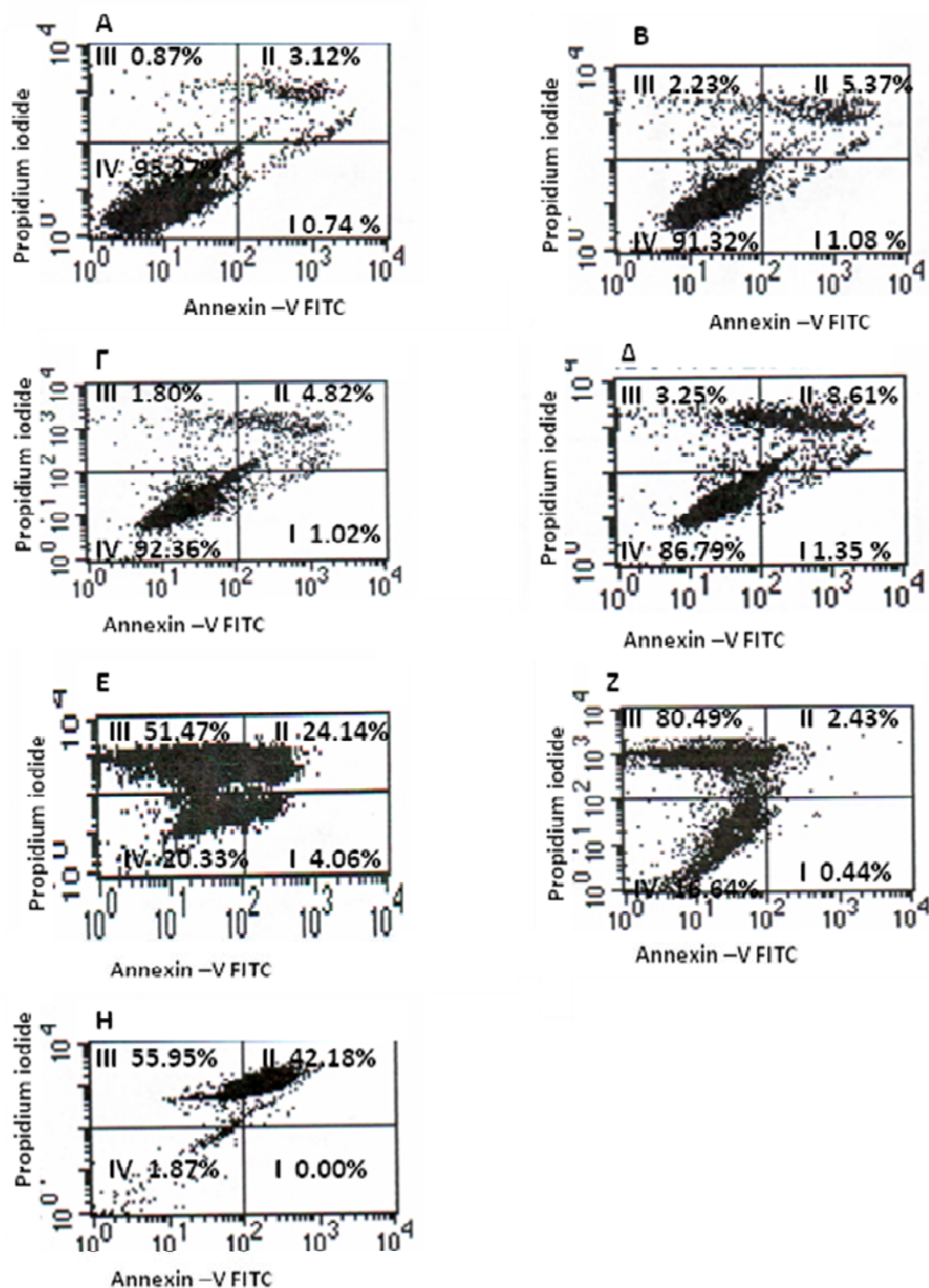
Χρωματογράφημα 5: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα υδατοδιαλυτού κλάσματος του αποξηραμένου MeOH εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού *S. horvati* spp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 20.



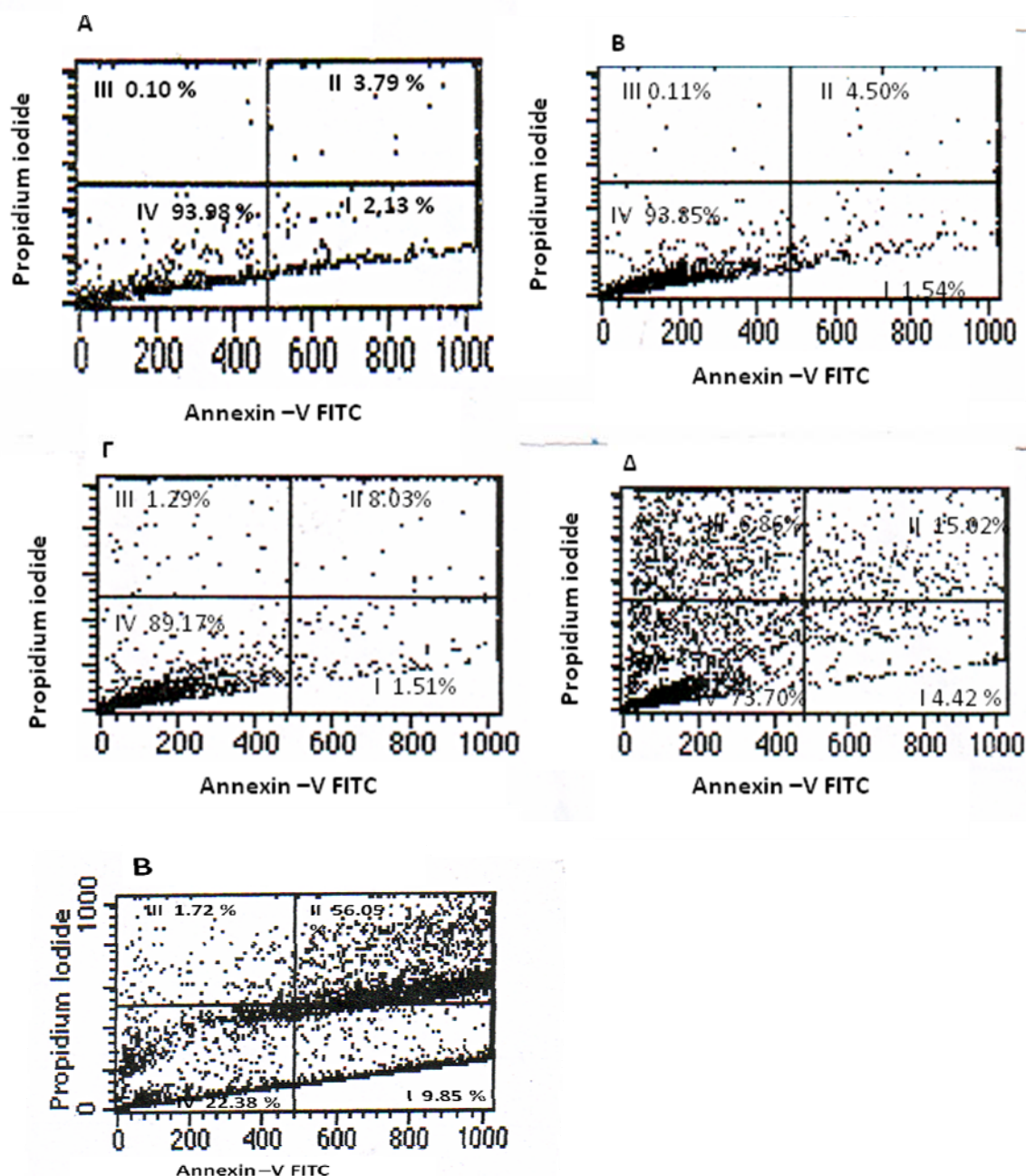
Χρωματογράφημα 6: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα DHS-GC-MS φυτικού υλικού του αρωματικού φυτού *S. horvati* ssp *macrophylla*. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και αναφέρονται στον πίνακα 21.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

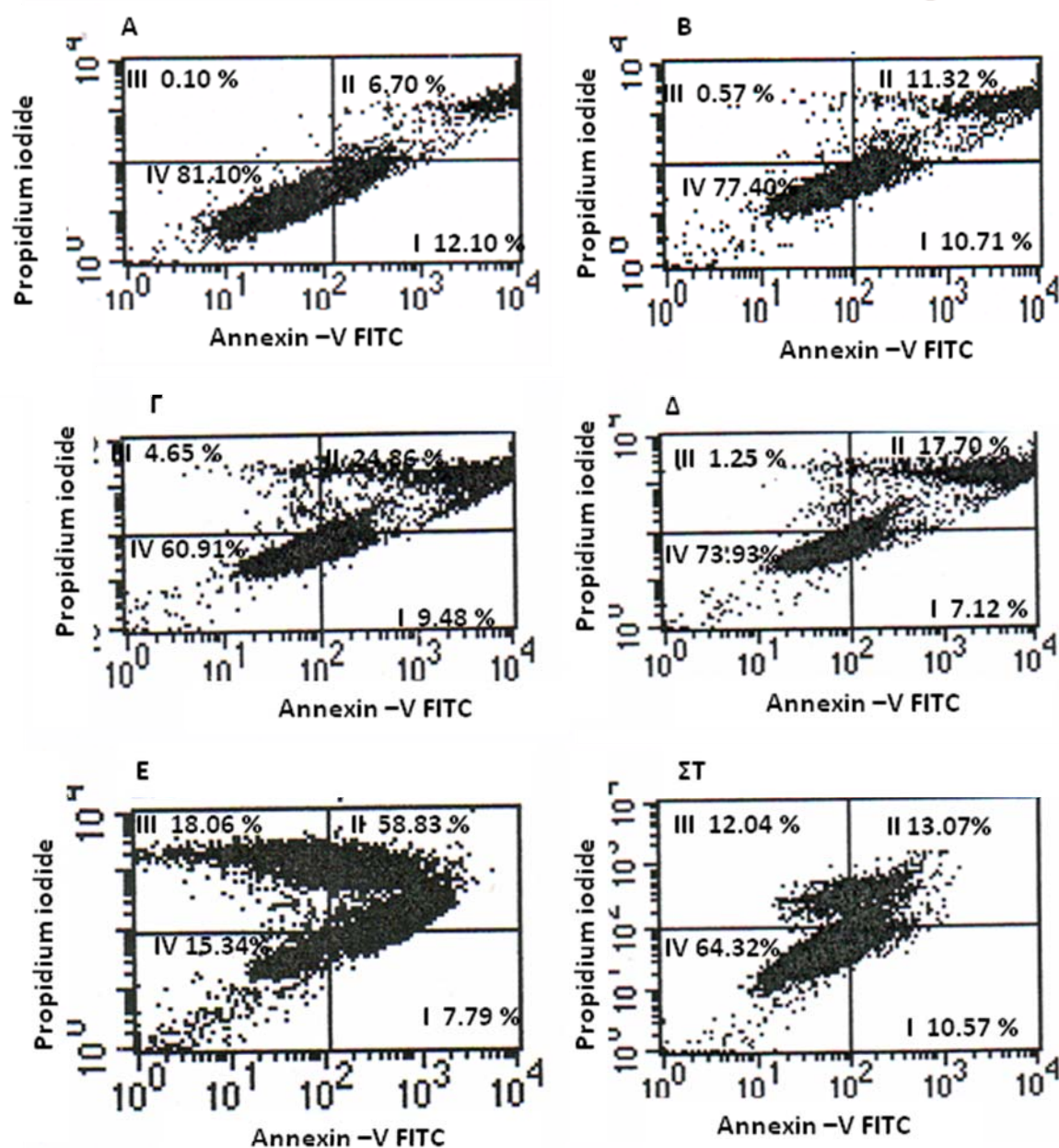
Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μετρήσεων κυτταρομετρίας ροής



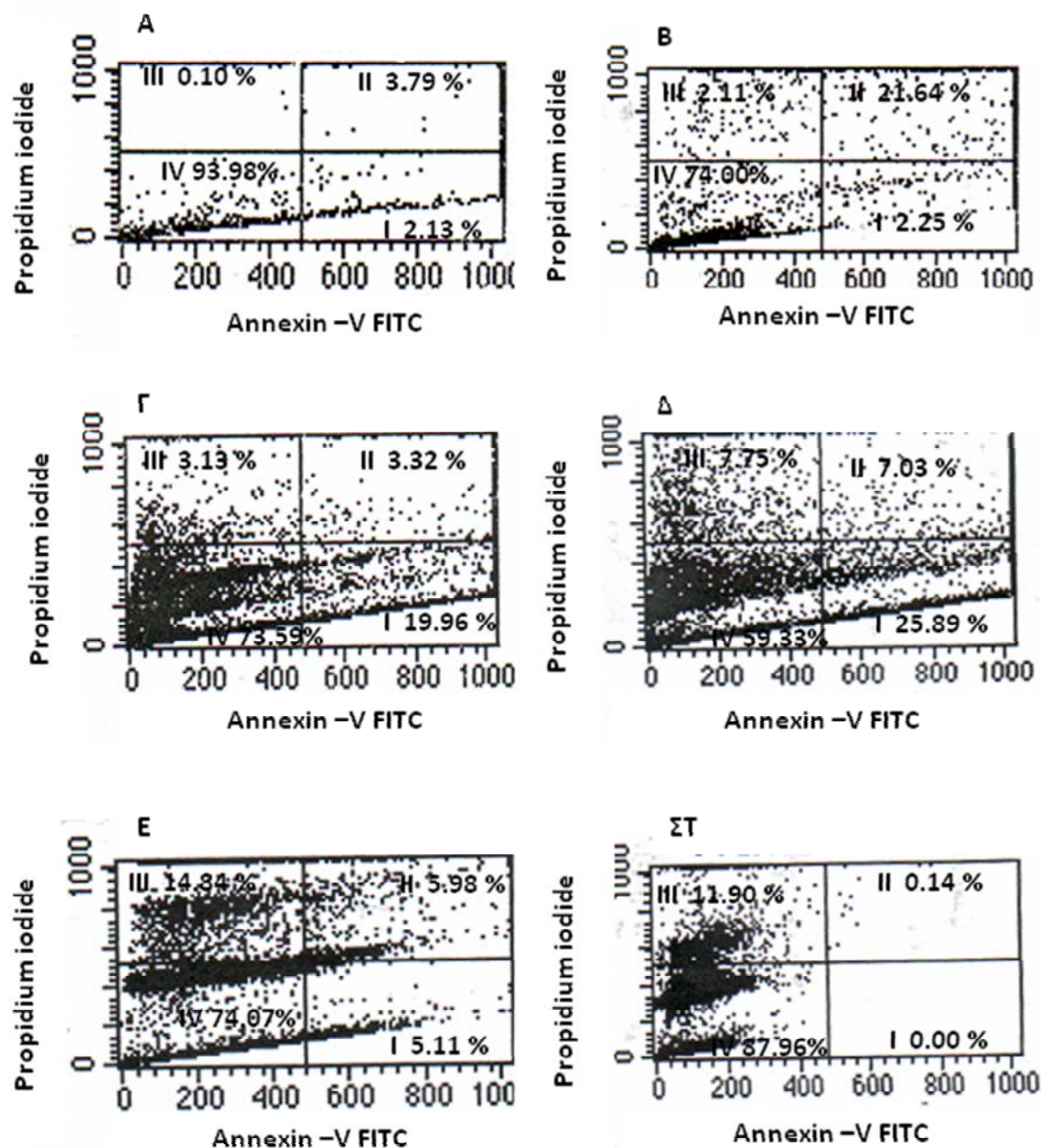
Εικόνα 76: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *O. vulgare* spp. *hirtum* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες A, B, Γ, Δ, E, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων.



Εικόνα 77: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *S. horvatii* ssp. *macrophylla* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων.



Εικόνα 78: Αντιπρωτευτικά αποτελέσματα κυταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *T. polium* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων.



Εικόνα 79: Αντιπρωτευτικά αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από επίδραση εκχυλίσματος του *R. officinalis* συγκέντρωσης 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg mL⁻¹ σε καρκινικά κύτταρα A549 για 24 h και σήμανση των κυττάρων με annexin V/PI (Εικόνες Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ, αντίστοιχα). Η εκατοστιαία αναλογία (%) των πρώιμων αποπτωτικών (I), όψιμων νεκρωτικών (II), νεκρωτικών (III) και ζωντανών κυττάρων (IV) εκφράστηκε έπειτα από μέτρηση 10.000 κυττάρων.