



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

«Μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών της Ηπείρου και των νανοσωματιδίων αυτών, σε μικροβιακές καλλιέργειες γνωστών ανθρώπινων παθογόνων με πολλαπλές ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά»

ΖΩΗ ΜΟΡΑΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

«Μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών της Ηπείρου και των νανοσωματιδίων αυτών, σε μικροβιακές καλλιέργειες γνωστών ανθρώπινων παθογόνων με πολλαπλές ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά»

ΖΩΗ ΜΟΡΑΛΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΤΟΥ Κ. _____

Συν-επιβλέποντες: Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής
Ιωάννης Σαΐνης, ΕΔΙΠ

Θέμα: «Μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών της Ηπείρου και των νανοσωματιδίων αυτών, σε μικροβιακές καλλιέργειες γνωστών ανθρώπινων παθογόνων με πολλαπλές ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΤΡΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....^/...-...-.....

1. Ιωάννης Σαΐνης, ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Συν-Επιβλέποντες)
2. Βασιλική Μπούμπα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)
3. Νικόλαος Κουρκουμέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.
Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ο/Η Γραμματέας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» και εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκινικών Κυττάρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. κ. Ιωάννη Σαΐνη για την καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές, την υπομονή και τη στήριξη που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα μέχρι και την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή και επιβλέποντα κ. Σωτήριο Χατζηκακού, υπεύθυνο του δι-ιδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος της «Ανόργανης Βιολογικής Χημείας», που δέχτηκε να είναι μέλος της τετραμελούς επιτροπής αξιολόγησης αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και την Δρ. κ. Χριστίνα Μπαντή για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια κατά την παρασκευή των υδατικών εκχυλισμάτων και των νανοσωματιδίων αργύρου που συντέθηκαν στο εργαστήριο της Ανόργανης Βιολογικής Χημείας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Βασιλική Μπούμπα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που δέχτηκε να είναι μέλος της τετραμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας καθώς και τον κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που επίσης δέχτηκε να είναι μέλος της τετραμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Ακολουθώς, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρα κ. Δέσποινα Βόγγολη και την Δρ. κ. Αναστασία Τούκα, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την εκπόνηση των πειραμάτων, την καθοδήγηση, την ψυχολογική υποστήριξη και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη σε όλους τους τομείς, την υπομονή τους και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθ'όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποκτούν ανοχή στα αντιβιοτικά και κατά συνέπεια η χρήση αυτών των αντιβιοτικών καθίσταται αναποτελεσματική στην αντιμετώπιση ακόμη και κοινών λοιμώξεων. Το φαινόμενο αυτό, της μικροβιακής αντοχής, εξαπλώνεται ολοένα και περισσότερο αποτελώντας μία σοβαρή απειλή για όλο τον κόσμο. Ως εκ τούτου, σήμερα, όλο και περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν εξαιτίας της αδυναμίας μας να αντιμετωπίσουμε βακτήρια πολυανθεκτικά σε μια πληθώρα κοινών και μέχρι πρότινος αποτελεσματικών αντιβιοτικών. Συνεπώς, τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα με σκοπό την ανακάλυψη νέων και εναλλακτικών μορίων με αντιμικροβιακή δραστηριότητα, από διαφορετικές πηγές.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε με τη μέθοδο διάχυσης άγαρ, η αντιμικροβιακή δράση υδατικών εκχυλισμάτων από τα φαρμακευτικά φυτά *Cistus incanus*, *Salvia officinalis*, *Primula veris* και *Daphnes oleoides*, καθώς και νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) που παρασκευάστηκαν από τα παραπάνω εκχυλίσματα. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι τόσο το υδατικό εκχύλισμα της *Salvia officinalis*, όσο και τα AgNPs της *Primula veris* έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus incanus* ήταν ιδιαίτερα δραστικό έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων ενώ τα AgNPs των *Salvia officinalis* και *Daphnes oleoides* ιδιαίτερα δραστικά έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών, σε βαθμό συγκρίσιμο με της σιπροφλοξασίνης, ενός αντιβιοτικού φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

ABSTRACT

Various bacteria have the ability to gain resistance to antibiotics and as a result the use of these antibiotics becomes ineffective in treating even common infections. This phenomenon of antimicrobial resistance is spreading more and more, posing a serious threat to the whole world. As a result, more and more people are dying today because of our inability to treat bacteria that are highly resistant to a variety of common and previously effective antibiotics. Therefore, in recent years, there is a growing interest in research aimed at discovering new and alternative molecules with antimicrobial activity, from different sources.

In the present study, the antimicrobial activity of aqueous extracts from the medicinal plants *Cistus incanus*, *Salvia officinalis*, *Primula veris* and *Daphnes oleoides*, as well as silver nanoparticles (AgNPs) prepared from the above were investigated by the agar diffusion method. Our results show that both the aqueous extract of *Salvia officinalis* and the AgNPs of *Primula veris* have significant antimicrobial activity. The aqueous extract of *Cistus incanus* was particularly active against Gram-positive bacteria while the AgNPs of *Salvia officinalis* and *Daphnes oleoides* were particularly active against Gram-negative bacterial strains, comparable to ciprofloxacin, an antibiotic used as a positive control.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ.....	17
1.1.1. Εξάπλωση μικροβιακής αντοχής	18
1.1.2. Μικροβιακή αντοχή σήμερα σε παγκόσμια κλίμακα	20
1.2. ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	26
1.2.1. Αντιβιοτικά	28
1.2.1.i Κατηγορίες αντιβιοτικών.....	28
1.2.1.ii Τρόπος δράσης αντιβιοτικών	30
1.2.2. Γνωστά ανθρώπινα παθογόνα ανθεκτικά σε κοινά αντιβιοτικά	34
1.2.3. Στροφή στα φαρμακευτικά φυτά	35
1.3. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ	37
1.3.1. <i>Cistus incanus</i>	38
1.3.1.i Χαρακτηριστικά	38
1.3.1.ii Δραστικές ουσίες.....	39
1.3.1.iii Φαρμακευτική δράση	41
1.3.2. <i>Salvia officinalis</i>	43
1.3.2.i Χαρακτηριστικά	43
1.3.2.ii Δραστικές ουσίες.....	45
1.3.2.iii Φαρμακευτική δράση	46
1.3.3. <i>Primula veris</i>	49
1.3.3.i Χαρακτηριστικά	49
1.3.3.ii Δραστικές ουσίες.....	50
1.3.3.iii Φαρμακευτική δράση	52

1.3.4. <i>Daphnes oleoides</i>	53
1.3.4.i Χαρακτηριστικά	53
1.3.4.ii Δραστικές ουσίες.....	55
1.3.4.iii Φαρμακευτική δράση	56
1.3.5. Αιθέρια έλαια φαρμακευτικών φυτών	58
1.4 NANOΣΩΜΑΤΙΔΙΑ	62
1.4.1. Φαρμακευτική δράση νανοσωματιδίων.....	64
1.4.1.i Αντικαρκινική δράση	64
1.4.1.ii Αντιβακτηριακή δράση	64
1.4.2. Νανοσωματίδια αργύρου, AgNPs.....	65
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	67
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	69
3.1. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων και νανοσωματιδίων αργύρου	69
3.1.1. Συλλογή φυτών	69
3.1.2. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων	69
3.1.3. Παρασκευή AgNPs παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων	70
3.2 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης	71
3.2.1 Δοκιμή επιλογής ιδανικού θρεπτικού υλικού	72
3.2.2 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων.....	73
3.2.3 Agar diffusion method	76
3.2.4 Δοκιμή επίδρασης διαλύτη DMSO.....	78
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ <i>C.incanus</i>	80
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>S. officinalis</i>	82

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>P. veris</i>	85
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ <i>Daphnes oleoides</i> ..	87
4.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	89
4.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ AgNPs ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	90
4.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΑ AgNPs	91
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
5.1 <i>Cistus incanus</i>	93
5.2 <i>Salvia officinalis</i>	96
5.3 <i>Primula veris</i>	97
5.4 <i>Daphnes oleoides</i>	98
5.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	100
5.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ AgNPs ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	100
5.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΑ AgNPs	102
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	104

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Ως αντιβιοτικά ορίζονται οι ουσίες εκείνες που έχουν παραχθεί για να καταστρέφουν το μικρόβιο χωρίς να βλάπτουν τον ξενιστή και αποτελούν ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για την καταπολέμηση των απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων. Η ανακάλυψή τους έχει άμεση επιρροή στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Δυστυχώς, ζούμε σε μια εποχή που άνθρωποι σε όλο τον κόσμο πεθαίνουν από μη θεραπεύσιμες λοιμώξεις λόγω της εμφάνισης και της εξάπλωσης της αντοχής στα αντιβιοτικά [1].

Το 1928 ο Alexander Fleming ανακάλυψε το πρώτο φυσικό αντιβιοτικό, την πενικιλίνη, μετά από μια τυχαία παρατήρηση κατά την οποία ο μύκητας του γένους *Penicillium notatum* φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων σε καλλιέργεια σταφυλόκοκκου. Η ανακάλυψη της πενικιλίνης αποτέλεσε σημαντικό γεγονός στην ιστορία της ιατρικής καθώς κατά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο βοήθησε στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των βακτηριακών μολύνσεων από σταφυλόκοκκο. Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1940 ανακαλύφθηκαν πολυάριθμοι τύποι αντιβιοτικών σημαίνοντας τη χρυσή εποχή των αντιβιοτικών αφού μειώθηκαν δραματικά οι ασθένειες και οι θάνατοι από τις λοιμώδεις νόσους. Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση τους οδήγησε στην ταχεία εξάπλωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά [2].

Ο όρος μικροβιακή αντοχή αναφέρεται στην αντοχή που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί στις αντιμικροβιακές ουσίες, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ή και καθόλου ευαίσθητοι σε αυτές. Τα ανθεκτικά μικρόβια που δημιουργούνται δεν καταστρέφονται από τα αντιβιοτικά και έτσι μπορούν να επιβιώνουν να πολλαπλασιάζονται ελεύθερα και να μεταφέρουν την αντοχή στις επόμενες γενιές

μικροβίων, με αποτέλεσμα να επικρατούν και να αναπτύσσονται στο περιβάλλον αλλά και στη μικροβιακή χλωρίδα ανθρώπων και ζώων. Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο ως συνέπεια φυσικής επιλογής, κατά την οποία μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό, επικρατούν στον πληθυσμό των μικροοργανισμών, όταν αυτός ο πληθυσμός εκτεθεί στο αντιβιοτικό αυτό. Πρόκειται για μια από τις μεγαλύτερες διαχρονικά παγκόσμιες προκλήσεις δημόσιας υγείας καθώς επηρεάζει την ικανότητά μας να θεραπεύουμε μια σειρά λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια, παράσιτα, ιούς και μύκητες. Σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας διανύουμε την εποχή της «παναντοχής» αφού σε αρκετές χώρες όπως και στη δική μας, ασθενείς εμφανίζουν λοιμώξεις από βακτήρια ανθεκτικά σε όλα σχεδόν τα διαθέσιμα αντιβιοτικά. Η εμφάνιση και διασπορά της μικροβιακής αντοχής αφορά τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον [3].

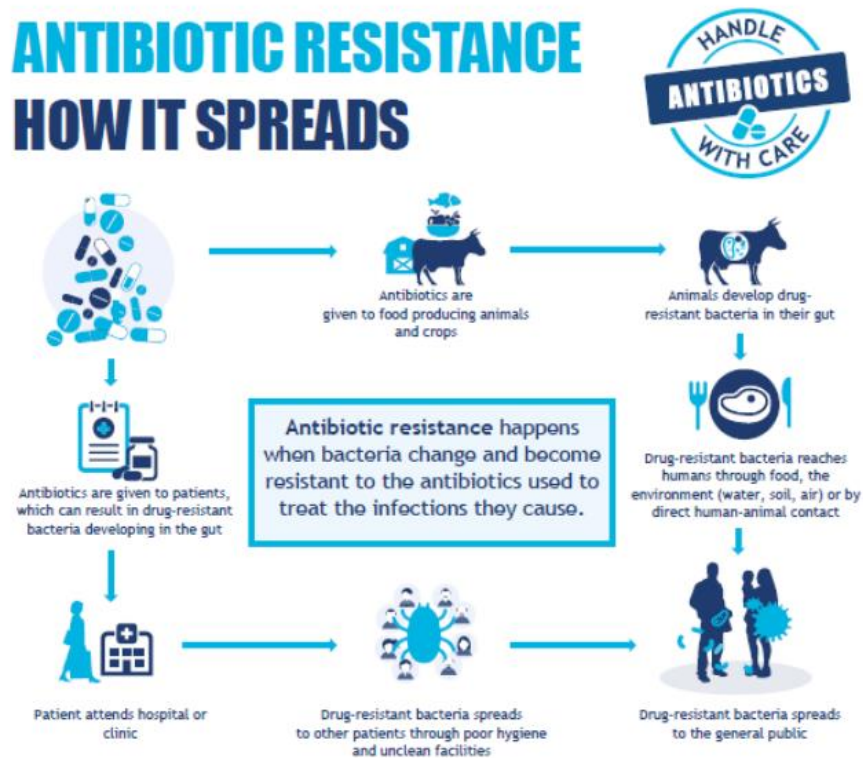
1.1.1. Εξάπλωση μικροβιακής αντοχής

Δυστυχώς, ήδη από την πρώτη εμφάνιση των αντιβιοτικών στην ιστορία της ιατρικής παρατηρήθηκε κατάχρηση αυτών με άμεση συνέπεια την εμφάνιση της ανθεκτικότητας των διάφορων μικροοργανισμών σε αυτά.

Κατά κύριο λόγο τα αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας οφείλονται στην υπερκατανάλωση και ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών. Μία επιπλέον σημαντική αιτία που συμβάλλει στο φαινόμενο αυτό είναι η χορήγηση ακατάλληλου τύπου αντιβιοτικού ή ακατάλληλης δοσολογίας και για χρονικό διάστημα διαφορετικό από το απαιτούμενο. Πολλές φορές αντιβιοτικά συνταγογραφούνται άσκοπα για ιογενείς λοιμώξεις, έναντι των οποίων δεν έχουν κανένα αποτέλεσμα. Ακόμη, όταν η διάγνωση

δεν γίνεται με ακρίβεια, τις περισσότερες φορές συνταγογραφούνται αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, δηλαδή αντιβιοτικά που σκοτώνουν μεγάλο ποσοστό διαφόρων βακτηρίων και όχι μόνο τα βακτήρια εκείνα που ευθύνονται για τη νόσο, επειδή δεν είναι γνωστός ο αιτιολογικός μικροοργανισμός [4].

Παράλληλα, αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία λοιμώξεων ή την πρόληψη μόλυνσης σε κατοικίδια ζώα ή και σε φυτά με αποτέλεσμα να προωθείται έτσι η εξέλιξη της ανθεκτικότητας. Ανθεκτικά βακτήρια που έχουν επιμολύνει είτε τα ζώα είτε το περιβάλλον μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της επαφής ή μέσω της τροφικής αλυσίδας με αποτέλεσμα να ξεκινάει έτσι ένας κύκλος μετάδοσης ασθενειών που είναι δύσκολο να θεραπευτούν [3].



Εικόνα 1: Πως διασπείρεται η μικροβιακή αντοχή [3].

1.1.2. Μικροβιακή αντοχή σήμερα σε παγκόσμια κλίμακα

Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα σύγχρονα προβλήματα της Δημόσιας Υγείας σε όλον τον κόσμο. Στην Ευρώπη 25.000 ασθενείς πεθαίνουν ετησίως εξαιτίας ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούν τα πολυανθεκτικά μικρόβια, ενώ το νούμερο αυτό ανέρχεται στους 700.000 σε παγκόσμια κλίμακα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προβλέπει ότι αν συνεχιστεί η ίδια κατάσταση, το 2050 θα πεθαίνουν δέκα εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο από μικροοργανισμούς που δεν μπορούν να καταπολεμηθούν με αντιβιοτικά [5].



Εικόνα 2: Μικροβιακή αντοχή: μια αυξανόμενη κρίση παγκοσμίως [3].

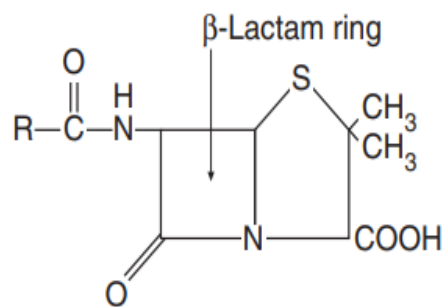
Στη χώρα μας έχουμε το υψηλότερο ποσοστό κατανάλωσης αντιβιοτικών στην Ευρώπη. Αποτέλεσμα αυτής της πρωτιάς είναι να έχουμε από τα υψηλότερα ποσοστά μικροβίων στα οποία τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά. Ο κίνδυνος που αντιμετωπίζουμε σήμερα

είναι λοιμώξεις που στο παρελθόν θεραπεύονταν να ξαναγίνουν θανατηφόρες γιατί τα αντιβιοτικά δεν θα είναι πλέον δραστικά στα μικρόβια που τις προκαλούν. Ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες ασθενών οι λοιμώξεις από ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μικρόβια μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο σε υψηλό ποσοστό (20%-70%) [6].

1.1.3. Μηχανισμοί αντίστασης

Προκειμένου τα βακτήρια να επιβιώσουν από τις διάφορες επιπτώσεις των αντιβιοτικών, αναπτύσσουν συνεχώς νέες αμυντικές στρατηγικές, οι οποίες καλούνται «μηχανισμοί αντίστασης». Το DNA δίνει στο βακτήριο την οδηγία να φτιάξει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι και αυτές που καθορίζουν τους μηχανισμούς αντίστασης του βακτηρίου. Αυτοί οι μηχανισμοί αλλάζουν συνεχώς με την πάροδο του χρόνου και εξελίσσονται με αποτέλεσμα να οδηγούν σε πιο ανθεκτικές λοιμώξεις. Τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μπορούν να διαδώσουν τα γονίδια αντοχής τους σε άλλα βακτήρια που δεν έχουν εκτεθεί σε αντιβιοτικά και με αυτόν τον τρόπο προκαλείται η ανησυχητική εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα διάφορα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια και οι μύκητες μπορούν να φέρουν γονίδια για διάφορους τύπους αντίστασης. Όταν τα βακτήρια τα οποία έχουν ήδη αναπτύξει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό έχουν τον σωστό συνδυασμό γονιδίων αντίστασης, μπορούν να καταστήσουν αναποτελεσματικά όλα τα αντιβιοτικά, με άμεση συνέπεια τις μη θεραπεύσιμες λοιμώξεις [7].

Από την αρχή της εποχής των αντιβιοτικών, εκείνα τα αντιβιοτικά που πρωτοχρησιμοποιήθηκαν και ήταν εξαιρετικά σημαντικά για τη σύγχρονη ιατρική της εποχής, ανήκουν στην κατηγορία αντιβιοτικών β-λακτάμης. Δηλαδή όλα τα αντιβιοτικά διαθέτουν



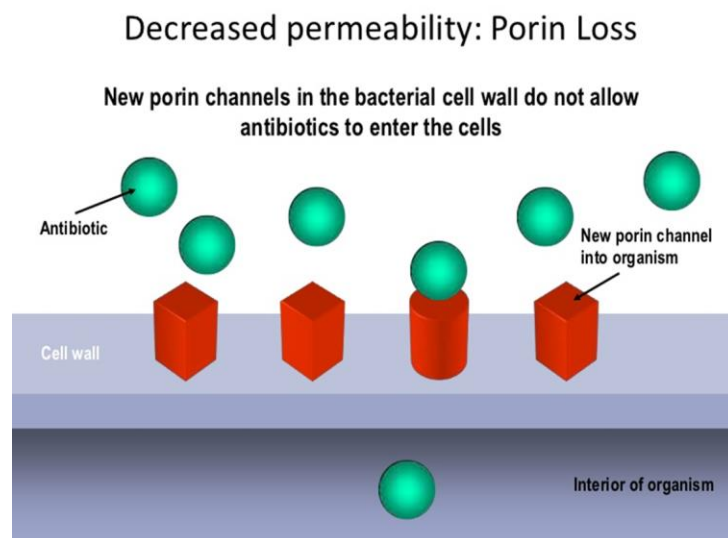
τον δακτύλιο αυτό της β-λακτάμης ο οποίος υποδεικνύει τον δακτύλιο β-λακτάμης [8].

αποδείχθηκε ότι είχε την ικανότητα να παρεμβαίνει στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (Εικόνα 3) [8]. Ουσιαστικά, τα αντιβιοτικά β-λακτάμης σκοτώνουν τα βακτήρια καθώς όταν βρεθούν μέσα στο κύτταρο δεσμεύονται πάνω σε πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (PBPs, penicillin binding proteins). Στόχος όλων των αντιβιοτικών β-λακτάμης είναι αυτές οι πρωτεΐνες PBP οι οποίες είναι και αυτές που δημιουργούν τις συνδέσεις μεταξύ των διαφόρων στρώσεων της πεπτιδογλυκάνης για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Όταν ο δακτύλιος συνδεθεί στις πρωτεΐνες, τότε αλλάζει η στερεοδιάταξη στο χώρο, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο σωστός σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο είναι απαραίτητο για να επιβιώσει το βακτήριο αφού προσφέρει προστασία από το εξωκυττάριο περιβάλλον και δίνει στο κύτταρο τη δομή του. Αυτή η κατηγορία αντιβιοτικών περιλαμβάνει όλους τους τύπους πενικιλίνης, όπως είναι η μεθικιλίνη, η οξακιλλίνη και η αμικιλίνη, τις κεφαλοσπορίνες ολοένα ευρύτερου φάσματος και τις πιο πρόσφατα εισαγόμενες και ευρέως φάσματος καρβαπενέμες [7].

Μεταξύ των στρατηγικών αντοχής των βακτηρίων διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες:

I. Μειωμένη διαπερατότητα-Απώλεια πορινών

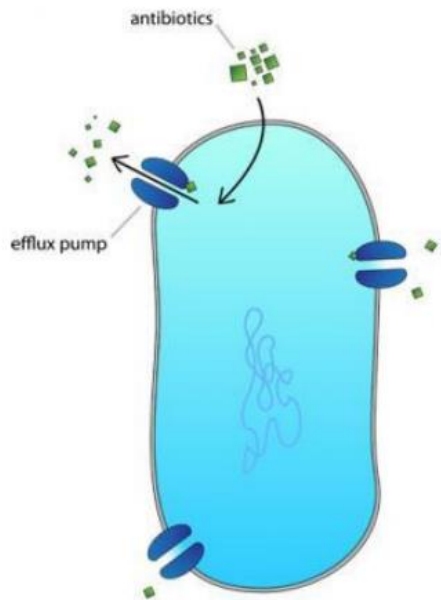
Ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια, είναι η αποτροπή του αντιβιοτικού να φτάσει στους ενδοκυτταρικούς ή περιπλασματικούς στόχους του μειώνοντας τη διαπερατότητα-εισροή του αντιβιοτικού. Προκειμένου το αντιβιοτικό να μπορέσει να δράσει, απαιτείται η εισαγωγή του στο ενδοκυττάριο περιβάλλον όπου βρίσκεται ο στόχος του, δηλαδή οι πρωτεΐνες PBPs. Θα πρέπει δηλαδή να υπάρχει η δυνατότητα διείσδυσης του αντιβιοτικού στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων το αντιβιοτικό θα πρέπει να διαπεράσει και τον επιπλέον φραγμό της εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν παραπάνω από τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Ωστόσο, πολλά βακτηριακά στελέχη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που περιορίζουν ή δεν επιτρέπουν καθόλου την εισροή ουσιών από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η δράση ορισμένων αντιβιοτικών στα διάφορα βακτήρια επηρεάζεται τελικά από πιθανές μεταβολές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, ή το μειωμένο αριθμό πορινών στην εξωτερική μεμβράνη, αφού για τη διέλευση τους εκμεταλλεύονται την παρουσία πορινών [9].



Εικόνα 4: Μειωμένη διαπερατότητα-Απώλεια πορινών στην εξωτερική μεμβράνη [9].

II. Αντλίες εκροής

Κατά το μηχανισμό αυτό, βακτηριακά στελέχη αναπτύσσουν την ικανότητα να συνθέτουν αντλίες εκροής οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να εξάγουν το αντιβιοτικό έξω από το βακτηριακό κύτταρο. Αυτές οι αντλίες είναι συνήθως πρωτεΐνες στη μεμβράνη του κυττάρου οι οποίες υπάρχουν φυσιολογικά στα βακτήρια για να μεταφέρουν έξω από το κυτταρόπλασμα τα διάφορα παραπροϊόντα που παράγονται κατά το μεταβολισμό του κυττάρου [10].

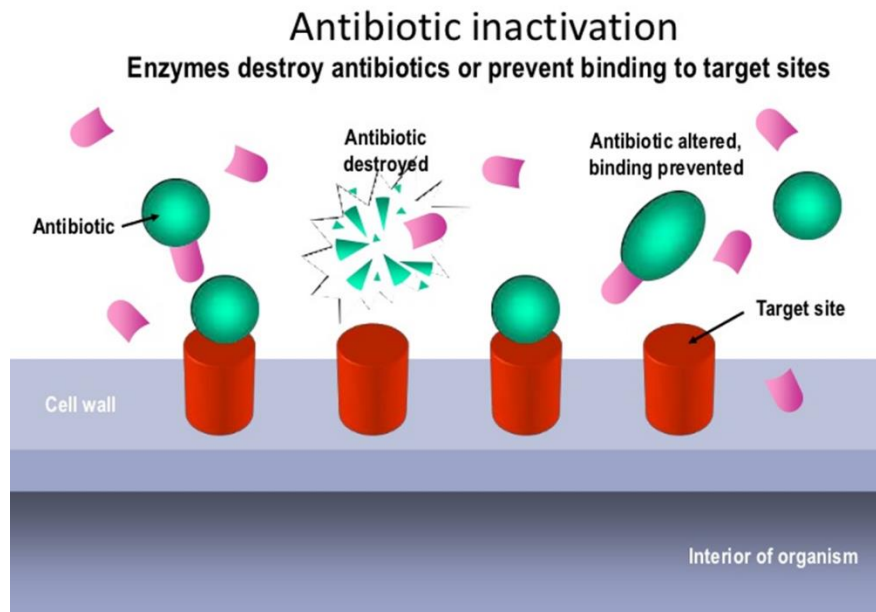


Εικόνα 5: Αντλίες εκροής [9].

III. Αδρανοποίηση του αντιβιοτικού

Μία από τις πιο επιτυχημένες στρατηγικές αντοχής των βακτηρίων είναι η παραγωγή ενζύμων, γνωστών ως β-λακταμάσες, οι οποίες αποδείχθηκε ότι αδρανοποιούν την αντιμικροβιακή δράση του αντιβιοτικού υδρολύοντας ή τροποποιώντας χημικά τη δομή του. Οι β-λακταμάσες παράγονται από βακτήρια ανθεκτικά στη β-λακτάμη για να

διασπάσουν τον δακτύλιο β-λακτάμης, ο οποίος θα ήταν και αυτός που θα συνδεόταν στις PBP's για να προκαλέσει την καταστροφή των κυττάρων, καθιστώντας έτσι το αντιβιοτικό μη αποτελεσματικό [9,10].

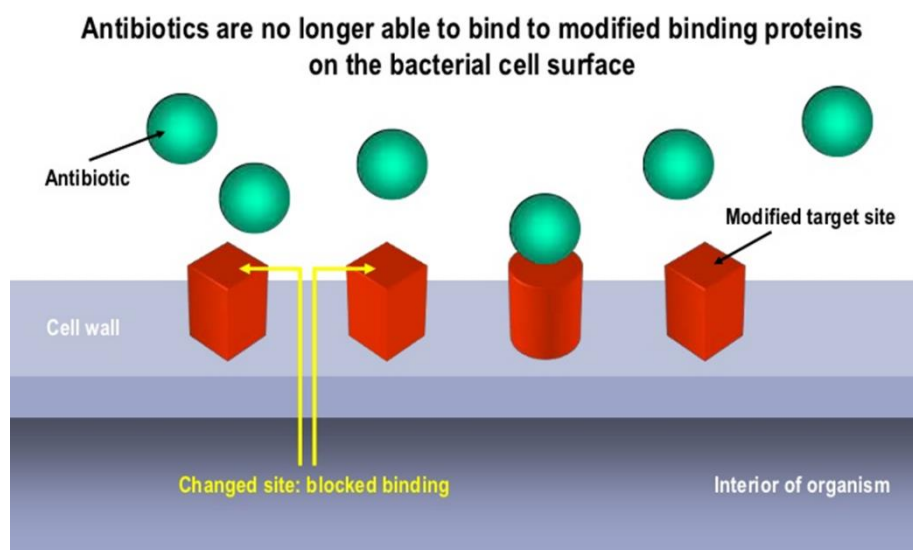


Εικόνα 6: Αδρανοποίηση του αντιβιοτικού [9].

IV. Τροποποίηση του στόχου

Λόγω τροποποίησης στο DNA ορισμένων βακτηρίων, δηλαδή λόγω κάποιας μετάλλαξης, τα βακτήρια μπορούν να φτιάξουν PBP's οι οποίες να μη συνδέονται με το δακτύλιο β-λακτάμης αλλά ταυτόχρονα να συνδέουν τις επάλληλες στρώσεις της πεπτιδογλυκάνης. Πρόκειται ουσιαστικά για έναν μηχανισμό κατά τον οποίο τα βακτήρια τροποποιούν τον ίδιο το στόχο του αντιβιοτικού ο οποίος σε κάθε περίπτωση είναι οι PBP's. Δηλαδή, τα βακτήρια συνθέτουν τις πρωτεΐνες με τρόπο τέτοιο ώστε να μην αναγνωρίζονται από το δακτύλιο της β-λακτάμης και ως εκ τούτου να μη συνδέονται με αυτόν και να μην αλλάζουν στερεοδιάταξη, με αποτέλεσμα να αντιστέκονται επιτυχώς στο αντιβιοτικό [9].

Structurally modified antibiotic target site



Εικόνα 7: Τροποποίηση του στόχου [9].

1.2. ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Ως παθογόνοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί εκείνοι οι οποίοι προκαλούν διαταραχές στην υγεία του ξενιστή τους. Το ανθρώπινο σώμα κατοικείται από τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς από τους οποίους η πλειονότητα όχι μόνο δεν είναι βλαβεροί, αλλά αντίθετα είναι χρήσιμοι ή και απαραίτητοι, καθώς συμμετέχουν σε σημαντικές διεργασίες. Υπάρχει ακόμη και η κατηγορία των μικροοργανισμών εκείνων οι οποίοι όταν βρίσκονται σε μικρό αριθμό και δε μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς και όργανα, αποτελούν φυσιολογική μικροχλωρίδα για τον άνθρωπο, είτε διότι παράγουν χρήσιμες χημικές ουσίες τις οποίες ο άνθρωπος δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του, είτε διότι συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού. Στην περίπτωση όμως που για κάποιο λόγο, αυξηθούν ή βρεθούν σε άλλους ιστούς, τότε προκαλούν την εκδήλωση ασθενειών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως δυνητικά παθογόνοι με χαρακτηριστικό παράδειγμα της *Escherichia coli*, που φυσιολογικά βρίσκεται στο στομάχι των

θερμόαιμων ζώων, όπως και των ανθρώπων, συμπληρώνοντας τη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου [11,12].

Τα παθογόνα βακτήρια είναι υπεύθυνα για διάφορες σοβαρές ασθένειες του ανθρώπου. Μερικά παραδείγματα θετικών κατά Gram γνωστών ανθρωπίνων παθογόνων βακτηρίων είναι:

- *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* υπεύθυνα για αιμόλυση ερυθρών αιμοσφαιρίων, καταστροφή λευκών αιμοσφαιρίων, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μαστίτιδα, μηνιγγίτιδα, πνευμονία, τροφικές δηλητηριάσεις
- *Streptococcus pneumoniae* υπεύθυνο για οξεία πνευμονία, ωτίτιδα, κολπίτιδα, σηψαιμία
- *Streptococcus pyogenes* υπεύθυνο για τα εξανθήματα, μία ασθένεια γνωστή ως οστρακιά, και στρεπτοκοκκική αμυγδαλίτιδα

Άλλα παραδείγματα αρνητικών κατά Gram γνωστών ανθρωπίνων παθογόνων βακτηρίων είναι:

- *Escherichia coli* υπεύθυνο για λοιμώξεις του ουροποιητικού, γαστρεντερίτιδα, περιτονίτιδα
- *Salmonella typhi* υπεύθυνο για σαλμονελώσεις, τυφοειδή πυρετό
- *Salmonella enteritidis* υπεύθυνο για γαστρεντερίτιδα, τροφικές δηλητηριάσεις
- *Neisseria gonorrhoeae* υπεύθυνο για βλεννόρροια
- *Klebsiella pneumoniae* υπεύθυνο για πνευμονία και λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος
- *Mycobacterium tuberculosis* υπεύθυνο για φυματίωση
- *Pseudomonas aeruginosa* υπεύθυνο για διάφορες νοσοκομειακές λοιμώξεις

1.2.1. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί και χρησιμοποιούνται ακόμη εκτενώς ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για τη θεραπεία διαφόρων βακτηριακών λοιμώξεων που προκαλούνται από συγκεκριμένα βακτήρια, σε ανθρώπους, ζώα και καλλιέργειες. Ωστόσο είναι αναγκαίο να επισημανθεί πως τα αντιβιοτικά θεραπεύουν τις λοιμώξεις που οφείλονται στα βακτήρια και όχι τους ιούς. Δηλαδή τα αντιβιοτικά δε δρουν στις ιογενείς λοιμώξεις όπως είναι η γρίπη ή το κοινό κρυολόγημα. Η άσκοπη κατανάλωση των αντιβιοτικών πρέπει να αποφεύγεται [1].

1.2.1.i Κατηγορίες αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες σύμφωνα με διαφορετικά κάθε φορά κριτήρια ταξινόμησης.

Μία πρώτη κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών γίνεται σύμφωνα με τον αριθμό μικροβίων που μπορούν να σκοτώσουν. Έτσι διακρίνονται οι εξής κατηγορίες:

1. Αντιβιοτικά στενού φάσματος, αυτά που στοχεύουν σε συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων
2. Αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, αυτά που στοχεύουν σε διάφορους τύπους βακτηρίων [3].

Μία δεύτερη κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών και πιο σημαντική, γίνεται με βάση τη χημική δομή τους. Έτσι διακρίνονται οι εξής κατηγορίες:

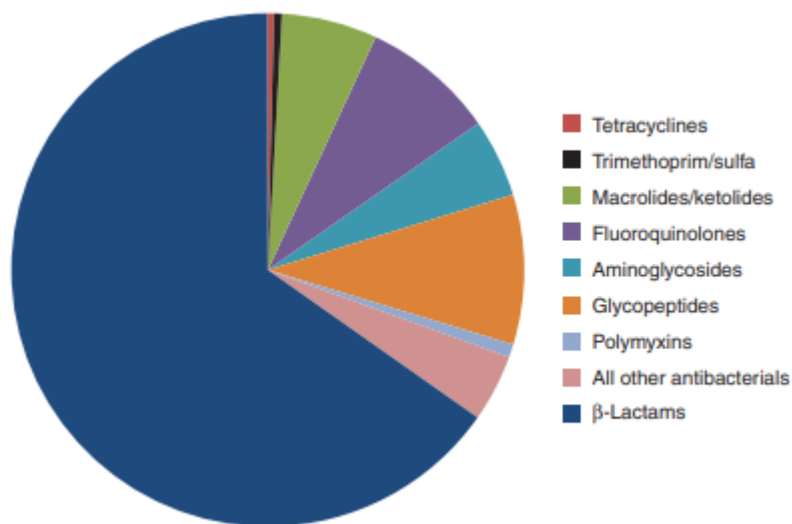
1. Πενικιλίνες, όπως η πενικιλίνη, η αμοξυκιλλίνη και η αμπικιλίνη οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία μιας ποικιλίας λοιμώξεων,

συμπεριλαμβανομένων των δερματικών λοιμώξεων, των λοιμώξεων του θώρακα και των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος.

2. Κεφαλοσπορίνες, όπως η κεφαλεξίνη οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος λοιμώξεων, ενώ μερικές είναι επίσης αποτελεσματικές και για τη θεραπεία πιο σοβαρών λοιμώξεων, όπως η σηψαιμία και η μηνιγγίτιδα.
3. Τετρακυκλίνες, όπως η τετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της ακμής και συγκεκριμένων δερματικών παθήσεων.
4. Μακρολίδια όπως η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη, τα οποία μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη θεραπεία λοιμώξεων του πνεύμονα και του θώρακα ή ως εναλλακτική λύση για άτομα με αλλεργία στην πενικιλίνη ή για τη θεραπεία στελεχών βακτηρίων ανθεκτικών στην πενικιλίνη.
5. Κινολόνες, όπως η σιπροφλοξασίνη οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος λοιμώξεων, ιδιαίτερα των λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος.
6. Αμινογλυκοζίδες, όπως η καναμυκίνη, η στρεπτομυκίνη και η γενταμικίνη, οι οποίες τείνουν να χρησιμοποιούνται μόνο στο νοσοκομείο για τη θεραπεία πολύ σοβαρών ασθενειών όπως η σηψαιμία, καθώς μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες, όπως απώλεια ακοής και νεφρική βλάβη [13, 14].

Σύμφωνα με έρευνα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, από το 2004 έως το 2014, τα αντιβιοτικά β-λακτάμης ήταν η πιο χρησιμοποιούμενη κατηγορία αντιβακτηριακών παραγόντων έναντι των μολυσματικών ασθενειών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, οι β-λακτάμες αντιπροσωπεύουν περίπου το 65% του συνόλου των συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών φαρμάκων με τις κεφαλοσπορίνες να καταλαμβάνουν σχεδόν το μισό

ποσοστό. Σε μικρότερες αναλογίες οι φθοροκινολόνες 8% τα μακρολίδια 6%, οι αμινογλυκοζίδες, 5% και οι τετρακυκλίνες 0,4%, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό καλύπτεται από άλλα αντιβιοτικά [15].

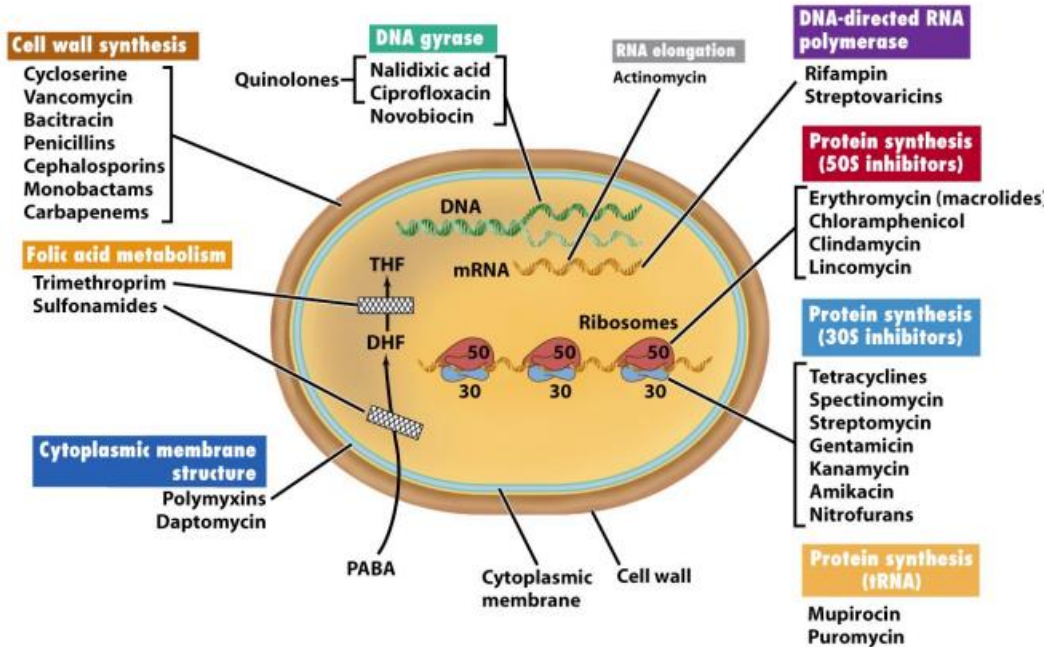


Εικόνα 8: Ποσοστό αντιβιοτικών που συνταγογραφήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 2004 έως το 2014 το οποίο εμφανίζεται ως εξής: β-λακτάμες 65,24%, γλυκοπεπίδια 9%, φθοροκινολόνες 8%, μακρολίδια 6%, αμινογλυκοζίδες 5%, πολυμυξίνες 1%, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη 0,5%, τετρακυκλίνες 0,4%, όλα τα άλλα αντιβιοτικά 4,21%. [15].

1.2.1.ii Τρόπος δράσης αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά στενού και ευρέος φάσματος στοχεύουν συγκεκριμένα μέρη ή διεργασίες μη ανθεκτικών βακτηρίων για να τα σκοτώσουν ή να σταματήσουν την ανάπτυξή τους. Οι στόχοι των αντιβιοτικών περιλαμβάνουν κυρίως το κυτταρικό τοίχωμα ή και την κυτταρική μεμβράνη, τα ριβοσώματα, τα νουκλεϊκά οξέα, τον κυτταρικό μεταβολισμό και τα βακτηριακά κυτταρικά ένζυμα. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τρόποι δράσης των αντιβιοτικών κατά των βακτηρίων: 1) Αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, 2) Αναστολή σύνθεσης πρωτεϊνών (τόσο στην 50S όσο και στην 30S βακτηριακή

ριβωσωμική υπομονάδα), 3) Αναστολή της αντιγραφής του DNA, 4) Διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 9) [16].



Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών κατά των βακτηρίων [16].

I. Αντιβιοτικά που στοχεύουν στο κυτταρικό τοίχωμα.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης και τα γλυκοπεπτιδία τα οποία είναι και αυτά που αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Η δραστηρότητά τους στηρίζεται στην παρεμπόδιση σύνθεσης της βακτηριακής πεπτιδογλυκάνης, δηλαδή του βασικού συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος.

Πιο συγκεκριμένα, ο δακτύλιος β-λακτάμης που διαθέτουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης συνδέεται ομοιοπολικά στις PBP's αναστέλλοντας το τελικό στάδιο σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης με αποτέλεσμα να επέρχεται λύση του κυττάρου. Τα αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την καταπολέμηση

των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων λόγω του ότι το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες.

Τα γλυκοπεπτίδια δρουν με παρόμοιο μηχανισμό καθώς συνδέονται στο τμήμα της πεπτιδικής πλευρικής αλυσίδας της πρόδρομης υπομονάδας πεπτιδογλυκάνης, αποτρέποντας τη δέσμευση με την PBP και κατ'έπείτασιν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής είναι η βανκομυκίνη [17].

II. Αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών

Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών καταλύεται από τα ριβοσώματα. Το βακτηριακό ριβόσωμα 70S αποτελείται από δύο υπομονάδες ριβονουκλεοπρωτεϊνών, τις υπομονάδες 30S και 50S. Ουσιαστικά τα αντιβιοτικά, ούτως ώστε να αναστείλουν τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών στοχεύουν στην υπομονάδα 30S ή 50S του βακτηριακού ριβοσώματος [17].

Αναστολείς της υπομονάδας 30S: αμινογλυκοζίτες και τετρακυκλίνες

Οι αμινογλυκοζίτες είναι θετικά φορτισμένα μόρια τα οποία προσκολλώνται στην αρνητικά φορτισμένη εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη σχηματίζοντας μεγάλους πόρους, που επιτρέπουν την εύκολη διείσδυση του αντιβιοτικού μέσα στο βακτήριο. Ο κύριος στόχος δράσης είναι το βακτηριακό ριβόσωμα όπου και αλληλεπιδρούν με το 16S rRNA της υπομονάδας 30S μέσω δεσμών υδρογόνου. Προκαλούν λανθασμένη ανάγνωση και πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης του mRNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντιβιοτικών της κατηγορίας αυτής είναι η στρεπτομυκίνη, η καναμυκίνη και η νεομυκίνη.

Οι τετρακυκλίνες αποτελούν αντιβιοτικά ευρέος φάσματος τα οποία χρησιμοποιούνται σημαντικά στη θεραπευτική ιατρική. Δρουν στις διατηρημένες αλληλουχίες του 16S rRNA της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S και εμποδίζουν τη δέσμευση του t-RNA στη θέση A του ριβοσώματος. Μερικά παραδείγματα είναι η τετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη και η οξυτετρακυκλίνη [17].

Αναστολείς της υπομονάδας 50S: χλωραμφενικόλη, μακρολίδια, οξαζολιδινόνες
Η χλωραμφενικόλη έχει παρόμοιο τρόπο δράσης με αυτόν των τετρακυκλινών, Δρουν αποτρέποντας τη σύνδεση του t-RNA στη θέση A του ριβοσώματος και ως εκ τούτου αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση.

Τα μακρολίδια επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεση στα αρχικά στάδιά της και πιο συγκεκριμένα στο στάδιο της επιμήκυνσης καθώς προκαλούν πρόωρη αποκόλληση των πεπτιδικών αλυσίδων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η ερυθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη.

Οι οξαζολιδινόνες όπως και οι παραπάνω κατηγορίες αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση στα πρώιμα στάδιά της. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η λινεζολίδη και η επερεζολίδη [17].

III. Αντιβιοτικά που δρουν ως αναστολείς της αντιγραφής του DNA

Οι κινολόνες αποτελούν μία κατηγορία αντιβιοτικών ενώσεων που αλληλεπιδρούν με τη βακτηριακή DNA γυράση, παρεμποδίζοντας την υπερελίκωση του βακτηριακού DNA που δε θα επέτρεπε τη σωστή αντιγραφή του. Συγκεκριμένα μια υποκατηγορία κινολονών, οι φθοροκινολόνες, είναι αντιβιοτικά ευρέος φάσματος τα οποία αναστέλλουν την αντιγραφή και τη

μεταγραφή του βακτηριακού DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής είναι η σιπροφλοξασίνη και η οφλοξασίνη [17].

IV. Αντιβιοτικά που δρουν ως αναστολείς του φολικού οξέος

Οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη αποτελούν αντιβιοτικά φάρμακα τα οποία αναστέλλουν διαφορετικά στάδια στο μεταβολισμό του φολικού οξέος. Ένας συνδυασμός φαρμάκων σουλφοναμιδών και τριμεθοπρίμης που δρουν σε διαφορετικά στάδια στην ίδια βιοσυνθετική οδό δείχνει συνέργεια και μειωμένο ρυθμό μετάλλαξης για αντοχή [17].

1.2.2. Γνωστά ανθρώπινα παθογόνα ανθεκτικά σε κοινά αντιβιοτικά

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για την ανθρώπινη ανάπτυξη καθώς επηρεάζει την ικανότητα αυτή των αντιβιοτικών να θεραπεύουν τις διάφορες λοιμώξεις που προκαλούνται από τα βακτήρια. Οι θεραπείες για μια αυξανόμενη λίστα λοιμώξεων, γίνονται ολοένα και λιγότερο αποτελεσματικές σε πολλά μέρη του κόσμου λόγω της ανθεκτικότητας. Οι σύγχρονες ιατρικές διαδικασίες, όπως μία μεγάλη χειρουργική επέμβαση, η μεταμόσχευση οργάνων, η διαχείριση του διαβήτη και η χημειοθεραπεία του καρκίνου θα γίνουν πολύ υψηλού κινδύνου χωρίς αποτελεσματικά αντιβιοτικά [7].

Η αποτελεσματικότητα των κοινώς χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών απειλείται λόγω της μικροβιακής αντοχής στη θεραπεία πολλών γνωστών ανθρωπίνων παθογόνων. Για παράδειγμα, τα είδη *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, έχουν γίνει ανθεκτικά σε βασικά αντιβιοτικά. Πρόσφατα, η αποτυχία των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς για τη θεραπεία της *Neisseria gonorrhoeae* έχει

επιβεβαιωθεί σε τουλάχιστον δέκα χώρες. Ομοίως, η αντοχή στα αντιβιοτικά καρβαπενέμης, μια θεραπεία έσχατης ανάγκης για το *Klebsiella pneumoniae*, έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο. Πολλά άλλα παθογόνα βακτήρια έχουν εξελιχθεί σε πολυανθεκτικές μορφές, όπως στην περίπτωση του *Mycobacterium tuberculosis* [7].

Πίνακας 1: Ανθεκτικότητα γνωστών παθογόνων βακτηρίων σε κοινά αντιβιοτικά [3,7,9]. Με ✓ συμβολίζεται η ανθεκτικότητα, ενώ με ✗ συμβολίζεται η ευαισθησία στο αντιβιοτικό.

ANTIBIOTIKO BAKTHPIO	Αμπικιλίνη	Μεθικιλίνη	Σιπροφλοξασίνη	Βανκομυκίνη
<i>Staphylococcus aureus</i>	✗	✓	✗	✓
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓	✓	✗	✓
<i>Escherichia coli</i>	✓	✓	✗	✗
<i>Aeromonas veronii</i>	✓	✓	✗	✗
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✓	✗	✗
<i>Acinetobacter</i>	✓	✓	✗	✗

1.2.3. Στροφή στα φαρμακευτικά φυτά

Σύμφωνα με έρευνα του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας που διεξήχθη το 2019 η παραγωγή των νέων αντιβιοτικών είναι εξαιρετικά πτωχή σε σχέση με τη ραγδαία εξέλιξη της μικροβιακής αντοχής (Εικόνα 10) [1].



Εικόνα 10: Παραγωγή νέων αντιβιοτικών κατά την πάροδο του χρόνου [1].

Η Εικόνα 10 υποδηλώνει πως η αδυναμία παραγωγής νέων αντιβιοτικών είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, ενώ ακόμη υπάρχουν επίσημες πληροφορίες πως δε θα υπάρξει στο άμεσο μέλλον παραγωγή νέων αντιβιοτικών δραστικών στα ανθεκτικά μικρόβια. Φαίνεται πως έχουμε φτάσει στο «Τέλος των αντιβιοτικών» γεγονός που οδηγεί τον κλάδο της επιστήμης να στραφεί στην αναζήτηση φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης [1].

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση διαφόρων φυτικών φαρμάκων τα οποία αποτελούν πηγές διαφορετικών μορίων πολλά από τα οποία παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες που μπορούν να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα από παθογόνους ή δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς που πιθανόν να το απειλούν. Ένας ακόμη λόγος για τον οποίο προτιμώνται τα φυτικά φάρμακα είναι τα χαμηλότερα επίπεδα τοξικότητας και η χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες φύση τους σε σύγκριση με τους συνθετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες των ήδη διαθέσιμων συνταγογραφούμενων φαρμάκων.

1.3. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ

Τα φυτά διαθέτουν μια απίστευτη ποικιλία φυσικών ενώσεων και έτσι δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η επιστήμη συμβάλει στην αξιοποίηση αυτής της τεράστιας ποικιλομορφίας. Η ανάπτυξη της χημείας και των βιολογικών επιστημών συντελεί ολοένα και περισσότερο στη μέγιστη αξιοποίηση των θεραπευτικών δράσεων όλων των φαρμακευτικών φυτών προκειμένου να αντικατασταθούν τα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά φάρμακα με νέα φάρμακα φυτικής προέλευσης. Οι ιστορικές πηγές δείχνουν ότι η χρήση φαρμακευτικών φυτών χρονολογείται από την Εποχή του Χαλκού [18].

Στη φαρμακολογία τα ακατέργαστα φάρμακα ορίζονται ως το φυσικό, μη εξευγενισμένο υλικό φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης που χρησιμοποιείται στην ιατρική. Τα φυτικά ακατέργαστα φάρμακα είναι δηλαδή φυτά ή μέρη τους σε μη επεξεργασμένη κατάσταση τα οποία συνήθως διαθέτουν έναν μεγάλο αριθμό χημικών ενώσεων με θεραπευτική δράση. Η αποτελεσματικότητα ουσιαστικά των φαρμακευτικών φυτών οφείλεται σε ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά τα οποία εντοπίζονται σε ολόκληρο το φυτό ή σε κάποιο μέρος αυτού όπως στα άνθη, στα φύλλα, στους σπόρους, ή στον κορμό [18].

Η Ήπειρος αποτελεί μία έκταση στην οποία εντοπίζεται μεγάλη ποικιλία φαρμακευτικών φυτών. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα εξής φαρμακευτικά φυτά της Ηπείρου: *Cistus incanus* με την κοινή ονομασία λαδανιά, *Salvia officinalis* με την κοινή ονομασία φασκόμηλο, *Primula veris* και *Daphnes oleoides*.

1.3.1. *Cistus incanus*

1.3.1.i Χαρακτηριστικά

Ένα από τα πιο πολύτιμα «όπλα» της φύσης είναι η λαδανιά ή κίστος, ένα θαμνώδες φυτό, ενδημικό στην Ελλάδα, το οποίο φυτρώνει κυρίως στην Κρήτη, αλλά και στην υπόλοιπη Ελλάδα από τα χαμηλά παραθαλάσσια μέρη ως και σε πιο υψηλά υψόμετρα, καθώς και σε όλη τη Μεσόγειο. Η λατινική και πιο επίσημη ονομασία του φυτού αυτού είναι *Cistus incanus* ή αλλιώς *Cistus creticus*. Ο *C. incanus* από βοτανική άποψη, ανήκει στην οικογένεια των Cistaceae η οποία περιλαμβάνει 7 γένη και 160 περίπου είδη, φυτά των παραμεσογείων χωρών και της Αμερικής. Στην Ελλάδα, αυτοφυές είναι το γένος *Cistus* με 5 αυτοφυή είδη. Αυτά είναι τα *Cistus incanus* ή *creticus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus salviifolius* και το πιο σπάνιο *Cistus laurifolius* [19, 20].

Ο *C. incanus* καθώς και όλα τα είδη αυτού του γένους εντοπίζονται σε ξηρές πετρώδεις θέσεις, σε δάση, καλύπτοντας μεγάλες εκτάσεις που ονομάζονται κιστώνες. Ευδοκιμούν κυρίως σε θερμές περιοχές με άφθονο ηλιακό φως και σχηματίζουν αραιές ή πυκνές συστάδες. Χαρακτηριστικά αυτού του φυτού είναι τα μεγάλα άνθη των οποίων το χρώμα ποικίλει, από λευκό ως ερυθρό με πιο συνηθισμένο το λιλά χρώμα, ενώ τα πέταλα είναι πέντε στρόγγυλα και πλατιά και έχουν την ιδιαιτερότητα να μοιάζουν με τσαλακωμένα (Εικόνα 11). Η ομορφιά στα άνθη της λαδανιάς είναι ότι δεν κρατούν πάνω από λίγες ώρες αλλά την περίοδο της ανθοφορίας η ίδια εμφανίζεται ως θάμνος γεμάτος μεγάλα φωτεινά άνθη [21, 22].



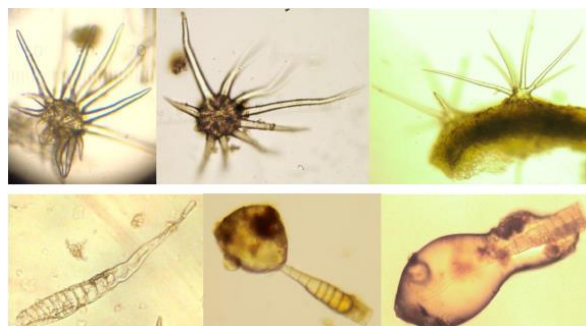
Εικόνα 11: Άνθη *Cistus incanus* [23].

Οι θεραπευτικές ιδιότητες της λαδανιάς, είναι γνωστές ήδη από την αρχαιότητα, εδώ και χιλιάδες χρόνια. Αξίζει να αναφερθεί πως η σημασία της λαδανιάς για τη διατροφή είναι τόσο μεγάλη, που το 1999 ανακηρύχθηκε ως το ευρωπαϊκό έτος αφιερωμένο στο φυτό αυτό. Στην πραγματικότητα το αιθέριο έλαιο *Cistus* έχει εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων & Φαρμάκων (FDA) ως πρόσθετο τροφίμων και αρωματικός παράγοντας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής και πολλοί κατασκευαστές προσφέρουν στην αγορά ένα «τσάι *Cistus*» που λαμβάνεται από την έγχυση φύλλων *C. incanus* ως χρήσιμο αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα για την πρόληψη χρόνιων παθήσεων. Ο *C. incanus* αποτελεί ένα κοινό φυτό τσαγιού στην Ελλάδα το οποίο διατίθεται στο εμπόριο ως έχειν σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση [24, 25].

1.3.1.ii Δραστικές ουσίες

Τα φύλλα όλων των ειδών *Cistus* καλύπτονται με τριχοειδείς αδένες, τρίχες που δημιουργούν μονωτικούς χώρους αποτρέποντας τον ιδρώτα και επιτρέποντας την

προσαρμογή στη σχετική ξηρασία. Οι τριχοειδείς αυτοί αδένες εκκρίνουν στην επιφάνειά τους τα αιθέρια έλαια και μια βαλσαμώδη ρητινική αρωματική ύλη, το λάβδανο (Εικόνα 12). Κυρίαρχες ενώσεις στη ρητίνη καθώς και στα φύλλα και τους βλαστούς του *C. incanus* φαίνεται να είναι τα διτερπένια ενώ άλλα τερπένια, όπως πολυφαινόλες και φλαβονοειδή συμβάλλουν επίσης στο χημικό προφίλ αυτού του είδους [26].



Εικόνα 12: Μικροσκοπικές εικόνες των αδενικών τριχών (τριχοσώματα) στην επιφάνεια των φύλλων *C. incanus* που παράγουν την ελαιορητίνη [26].

Τα διτερπένια φαίνεται να είναι μια σημαντική κατηγορία φυσικών χημικών ουσιών που παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δραστηριότητες και είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες φαρμακευτικές ιδιότητες του *C. incanus*. Μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί έξι δομικοί τύποι λαβδανικών διτερπενίων εκ των οποίων τα πέντε είναι τύπου μανουλοξειδίου. Συγκεκριμένα, αυτά είναι το μανουλοξείδιο, το 3-ακετοξυμανουλοξείδιο, το 3-υδροξυ-μανουλοξείδιο, το επιμανουλοξείδιο, το 2-κετομανουλοξείδιο καθώς και η σκλαρεόλη. Έχει αναφερθεί ότι τα διάφορα διτερπένια, ημισυνθετικά ή φυσικά, παρουσιάζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι ενός αριθμού λευχαιμικών και όγκων ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, έχει ακόμη αποδειχθεί πως τα διτερπένια που έχουν απομονωθεί από το γένος *Cistus* παρεμβαίνουν σε βιοχημικές οδούς απόπτωσης και τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα διτερπένια

εντοπίζονται στους βλαστούς, ενώ απουσιάζουν από τις ρίζες και εκκρίνονται από τα αδενικά τριχώματα στην επιφάνεια των φύλλων [26, 27]

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες οι κυρίαρχες χημικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τη φαρμακευτική δράση του *C. incanus* εκτός των διτερπενίων είναι οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή. Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία κατηγορία οργανικών χημικών ενώσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών δομικών μονάδων φαινόλης. Ο αριθμός και τα χαρακτηριστικά αυτών των δομών φαινόλης είναι και αυτά που προσδίδουν τις ξεχωριστές φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες που έχουν ορισμένα μέλη της κατηγορίας αυτής. Οι πολυφαινόλες οι οποίες εντοπίζονται σε πολλά φυτά, τα προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές μολύνσεις, ενισχύοντας έτσι τη φυσική τους άμυνα. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί πως όταν οι πολυφαινόλες εισέλθουν στον οργανισμό παρουσιάζουν ενεργό και ωφέλιμη βιολογική δράση. Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή: φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες και στυλβένια. Παραδείγματα πολυφαινολών με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση είναι η φλαβονόλη, η κερκετίνη και η καμπερόλη. Το γένος *Cistus* ανήκει στην κατηγορία φυτών με το πιο υψηλό επίπεδο πολυφαινολών στην Ευρώπη [28, 29].

1.3.1.iii Φαρμακευτική δράση

Όλα τα είδη *Cistus* χρησιμοποιούνται συχνά σε διάφορα φάρμακα για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Ο *C. incanus* έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως αντιφλεγμονώδες, αντιαλλεργικό, κυτταροτοξικός παράγοντας καθώς επίσης και για την επούλωση πληγών.

Σε διάφορες περιοχές ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί και κατά του κρυολογήματος και των στομαχικών παθήσεων. Τα φύλλα του φυτού χρησιμοποιούνται ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες στη φλεγμονή του δέρματος, σε φλεγμονώδεις ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και των νεφρών ή στους ρευματισμούς. Επιπλέον τα εκχυλίσματα των φύλλων συνίστανται σε χρόνιες παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, για παράδειγμα, σε έλκη και διάρροια, και σε ηπατικές παθήσεις. Ο *C. incanus* χρησιμοποιείται επίσης ως συμπλήρωμα διατροφής σε χρόνιες ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες [22, 30]. Τέλος αξίζει να αναφερθεί πως έχει αποδειχθεί ότι ξέπλυμα με κρύο τσάι του *Cistus* μπορεί να βοηθήσει σε μεγάλο ποσοστό στη μείωση του βακτηριακού αποικισμού των σκληρών ιστών του στόματος, ενώ ταυτόχρονα συνίσταται και για ασθενείς που πάσχουν από ξηροστομία αφού το τσάι αυτό φαίνεται να είναι άγευστο [31].

Το αντιμικροβιακό δυναμικό τόσο των διαφόρων εκχυλισμάτων, όσο και του αιθέριου ελαίου του *C. incanus* έχει διερευνηθεί σε διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έναντι των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών. Έχει αποδειχθεί πως η κύρια δραστηριότητα του αιθέριου ελαίου αποδίδεται στις διτερπενικές ενώσεις που περιέχονται στο φυτό. Σύμφωνα με μία πρόσφατη έρευνα, τα διτερπένια και ιδιαίτερα το πιο δραστικό, επιμανούλοξείδιο, τα οποία περιέχονται στο αιθέριο έλαιο του φυτού, έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae*, γνωστών παθογόνων βακτηρίων [32]. Ακόμη, σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί πως υδατικά εκχυλίσματα του φυτού αποδεικνύουν επίσης σημαντική αντιβακτηριακή δράση η οποία αποδίδεται στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Σύμφωνα με μία μελέτη σε Πανεπιστήμιο της Πολωνίας, στο Τμήμα της Αναλυτικής Χημείας το 2017, αποδείχθηκε

πως τα υδατικά εκχυλίσματα αποκάλυψαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και μάλιστα πιο αποτελεσματική έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων και συγκεκριμένα του *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis*, από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια τα οποία εξετάστηκαν [33]. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και ερευνητές του Τμήματος της Παθοφυσιολογίας την ίδια χρονολογία, σύμφωνα με τους οποίους, το αντιβακτηριακό δυναμικό αλκοολικών εκχυλισμάτων του *C. incanus* ήταν υψηλότερο έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων από τα αρνητικά. Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε και η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων και των φαινολικών ενώσεων αυτού του φυτού [30].

1.3.2. *Salvia officinalis*

1.3.2.i Χαρακτηριστικά

Η *Salvia officinalis* αποτελεί ένα από τα πιο πολύτιμα βότανα της φύσης για τον πλούτο του σε αιθέριο έλαιο και το ευρύ φάσμα θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Το φυτό αυτό ανήκει στην οικογένεια των Lamiales και είναι γνωστό στην Ελλάδα και ως «φασκόμηλο». Το γένος *Salvia* πήρε το όνομά του από το λατινικό ρήμα «salvare» που σημαίνει θεραπεύω, γεγονός που υποδεικνύει τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Αποτελεί το μεγαλύτερο γένος την οικογένειας αυτής και περιλαμβάνει περισσότερα από 900 είδη παγκοσμίως. Τα φυτά αυτού του γένους αναπτύσσονται σε όλο τον κόσμο και ιδιαίτερα στη Μεσόγειο, την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Η *S. officinalis* είναι εγγενής στην περιοχή της Μέσης Ανατολής και της Μεσογείου, ενώ εντοπίζεται στα περισσότερα μέρη της Ελλάδος και κατά κύριο λόγο στη Νότια Ελλάδα [34, 35].

Η *S. officinalis* είναι ένας πολυετής αειθαλής θάμνος, ύψους μόλις 50-80 εκατοστά, με έντονη αρωματική οσμή. Τα φύλλα του φυτού είναι ωσειδή με αιχμηρές άκρες, μήκους 4-10 εκατοστά και χρώματος γκριζοπράσινου, ενώ η επιφάνεια τους φαίνεται να καλύπτεται με βελούδινο τρίχωμα. Τα άνθη της έχουν χρώμα κόκκινο, ιώδες ή έντονο βιολετί και εμφανίζονται σε συστάδες (Εικόνα 13). Ευδοκίμει σε ηλιόλουστες και πετρώδεις περιοχές και η περίοδος ανθοφορίας είναι από το Μάιο έως και τον Ιούνιο [36, 37].



Εικόνα 13: Φύλλα και άνθη *Salvia officinalis* [36].

Η *S. officinalis* χρησιμοποιείται ήδη από την αρχαιότητα στην παρασκευή φαγητού, χάρη στις χωνευτικές της ιδιότητες, Έχει αναγνωρισθεί επίσης για τη χρήση της ως μπαχαρικό και άλλα φυσικά καρυκεύματα και αρωματικά με βάση την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Προτάθηκε μία δόση 0,1-0,3 g ημερησίως από το αιθέριο έλαιο ως φάρμακο και έως 15 σταγόνες την ημέρα ως μπαχαρικό στα τρόφιμα [38].

Ωστόσο, παρά τις θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτει η *S. officinalis*, διάφορες κλινικές μελέτες έχουν επισημάνει ότι σε περίπτωση κατανάλωσης εξαιρετικά μεγάλων ποσοτήτων εκχυλίσματος και πτητικού ελαίου *S. officinalis* (που αντιστοιχεί σε περισσότερα από 15g φύλλων) μπορεί να εμφανιστούν κάποιες ανεπιθύμητες

παρενέργειες όπως έμετος, σιελόρροια, ταχυκαρδία, ίλιγγος, εξάψεις, αλλεργικές αντιδράσεις, ακόμη και σπασμοί. Η σπασμωδική δράση του ελαίου οφείλεται στην άμεση επίδρασή του στο νευρικό σύστημα. Ακόμη, η κατανάλωση δε συνίσταται κατά την εγκυμοσύνη και το θηλασμό καθώς υπάρχει ο κίνδυνος να προκληθούν τοξικές επιδράσεις στο έμβρυο και παράλληλα να μειωθεί η παροχή του μητρικού γάλακτος [34, 38].

1.3.2.ii Δραστικές ουσίες

Τα διαθέσιμα δεδομένα όσον αφορά τα κύρια συστατικά που εντοπίζονται στην *S. officinalis* διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή και σε κάθε περίοδο συγκομιδής. Οι διαφορετικές αναλογίες εξαρτώνται από τις χρησιμοποιούμενες διαδικασίες εκχύλισης κατά την παρασκευή των αιθέριων ελαίων του φυτού. Οι κύριες δραστικές ουσίες που κυριαρχούν στα αιθέρια έλαια του φυτού είναι η α και η β θουγιόνη, η καμφορά, η 1,8-κινεόλη, ακολουθούμενη από α-πινένιο, καμπένιο, λιμονένιο, βορνεόλη, καθώς και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως διτερπένια, τριτερπένια, φλαβονοειδή, συστατικά φαινολικών οξέων και φαινολικούς γλυκοζίτες. Ακόμη εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες ένα ευρύ φάσμα συστατικών που περιλαμβάνει αλκαλοειδή, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, και στεροειδή [34, 39].

Πάνω από 120 βιοδραστικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί στην *S. officinalis*, οι περισσότερες εκ των οποίων έχουν απομονωθεί από το αλκοολικό εκχύλισμα, το υδατικό εκχύλισμα, το αιθέριο έλαιο και το παρασκεύασμα έγχυσης, δηλαδή το τσάι του φυτού. Τα αλκοολούχα και υδατικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, ιδιαίτερα σε ροσμαρινικό οξύ και λουτολίνη-7-γλυκοζίτη, ενώ στο μεθανολικό εκχύλισμα έχουν βρεθεί διάφορα φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ και το 3-καφεΐλοκινικό οξύ. Αρκετά φλαβονοειδή όπως το γλωρογενικό οξύ, το ελαγικό οξύ, η επικικατίνη, η γαλλική

επιγαλλοκατεχίνη, η κερκετίνη, το ροσμαρινικό οξύ, η ρουτίνη και η λουτεολίνη-7-γλυκοζίτη, καθώς και αρκετά πτητικά συστατικά όπως η βορνεόλη, η κινεόλη, η καμφορά και η θουγιόνη έχουν εντοπιστεί στο τσάι της *S. officinalis*. Το ροσμαρινικό οξύ και το ελλαγικό οξύ είναι τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στο εκχύλισμα έγχυσης, ακολουθούμενα από ρουτίνη, χλωρογενικό οξύ και κερσετίνη. Οι πιο πλούσιοι υδατάνθρακες που περιγράφονται σε αυτό το φυτό είναι η αραβινόζη, η γαλακτόζη, η γλυκόζη, η μανόζη, η ξυλόζη, τα ουρονικά οξέα και η ραμνόζη [34].

Η θουγιόνη, η καμφορά και οι τερπενικές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι θεωρούνται ως οι κύριες χημικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις πιθανές τοξικές επιδράσεις που προκαλεί η υπερδοσολογία του τσαγιού *S. officinalis* [38].

1.3.2.iii Φαρμακευτική δράση

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί διάφορες ερευνητικές μελέτες σχετικά με τις βιολογικές επιδράσεις της *S. officinalis*, οι οποίες έχουν αποκαλύψει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων του φυτού, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών, αντιοξειδωτικών, αντιεπιληπτικών, αντιαρτηρικών καθώς και αντιμικροβιακών.

Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται ήδη από την αρχαιότητα στη φαρμακοποιία λόγω της μεγάλης ποικιλίας ενεργών συστατικών που παρουσιάζουν πολυάριθμες βιολογικές δραστηριότητες. Οι αναφερόμενες βιολογικές δράσεις της *S. officinalis* περιλαμβάνουν τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων ρευματισμών, ελκών, ουρικής αρθρίτιδας, πυρετού, ζάλης, ναυτίας, εμετού, υπεργλυκαιμίας καθώς και επιληψίας. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ως στοματικό διάλυμα στη θεραπεία του ερεθισμού του λαιμού, σε μολυσμένα ούλα, στοματικά έλκη και κρυολογήματα. Το αιθέριο έλαιο της *S.*

officinalis έχει φαρμακευτικές επιδράσεις κατά των συνδρόμων του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος, της κυκλοφορίας του αίματος, των μεταβολικών καταστάσεων και των ενδοκρινών παθήσεων. Ακόμη αναφέρθηκε ότι το φασκόμηλο συμβάλλει στη θεραπεία της νόσου Alzheimer και έχει αντιφλεγμονώδη, οιστρογονική και ηρεμιστική δράση [36]. Εν καιρώ αποτελέσματα έχουν υποδείξει και μία αντικαταθλιπτική δράση του φυτού η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας για τη διαχείριση της κατάθλιψης. Τέτοια αποτελέσματα φαίνεται να συνδέονται με την πλούσια ποσότητα πολυφαινολικών ενώσεων που ανιχνεύονται [40].

Όσον αφορά την αντικαρκινική δράση της *S. officinalis*, σύμφωνα με έρευνες σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ζωικά μοντέλα καρκίνου, έχει διαπιστωθεί πως η κατανάλωση τσαγιού από το φυτό αυτό αποτρέπει τις φάσεις έναρξης της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Τα εκχυλίσματα έχουν δείξει προ-αποπτωτικές και ανασταλτικές επιδράσεις στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας, καρκίνο του παχέος εντέρου, λαρυγγικό καρκίνωμα, καρκίνωμα πνεύμονα και μελάνωμα. Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να σχετίζονται με την παρουσία των τερπενικών ενώσεων, οι οποίες έχουν δείξει κυτταροτοξικό και αντικαρκινικό χαρακτήρα και σε άλλες περιπτώσεις. Μεταξύ των флаβονοειδών, το ροσμαρινικό οξύ έχει αποδειχθεί πως είναι υπεύθυνο για την αναστολή της ανάπτυξης διαφόρων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων [34].

Επιπλέον, στοιχεία από προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η *S. officinalis* εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Το αιθέριο έλαιο των φύλλων του φυτού φαίνεται πως έχει την ικανότητα να «καθαρίζει» τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες αποτελούν κίνδυνο για αυτόν και μάλιστα σε αποτέλεσμα συγκρίσιμο με εκείνο που δίνει η βιταμίνη C. Αυτή η σημαντική αντιοξειδωτική δράση μπορεί να εξηγηθεί από την

αφθονία του φυτού σε 1,8-κινεόλη και λόγω της παρουσίας α-πινενίου, ενώσεων που έχουν αποδείξει την ισχυρή τους δράση έναντι των ελευθέρων ριζών. Η ικανότητα αυτή του φυτού να απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών, όπως η δυσλειτουργία του εγκεφάλου και καρδιακές παθήσεις, καθώς πρόκειται για ασθένειες που μπορεί να προκύψουν από κυτταρική βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες [38].

Τέλος, όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση του φυτού, τα αιθέρια έλαια έχουν επιδείξει ένα ευρύ φάσμα δραστηριότητας έναντι διαφόρων δοκιμασμένων μικροοργανισμών, υπεύθυνων για πολλές ανθρώπινες βακτηριακές λοιμώξεις. Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις της *S. officinalis* αποδίδονται στις τερπενοειδείς ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτό το φυτό. Έχει αποδειχθεί ότι η καμφορά, η θουγιόνη και η 1,8-κινεόλη είναι οι ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντιβακτηριακή δράση κατά της *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *B. mega therium*, *B. subtilis*, *B. cereus* και *Klebsiella oxytoca*. Επίσης, το ωλεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ, δύο τριτερπενοειδή της *S. officinalis*, έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη βακτηρίων ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα, όπως στα εντεροβακτήρια τα οποία είναι ανθεκτικά σε κοινά αντιβιοτικά όπως η βανκομυκίνη, στον *Streptococcus pneumoniae* ανθεκτικό στην πενικιλίνη και στον *Staphylococcus aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλίνη. Η επίδραση του ουρσολικού οξέος στο *Enterococcus faecium* και στα ανθεκτικά σε πολλά φάρμακα βακτήρια είναι ισχυρότερη από αυτή της αμπικιλίνης [34].

Σύμφωνα με μία έρευνα σε Πανεπιστήμιο της Κίνας το 2017 σημειώθηκε ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μία διάκριση η οποία αποδόθηκε στις διαφορές στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηριακών στελεχών. Το αντιμικροβιακό δυναμικό

αποδόθηκε στην παρουσία των τριών οξυγονωμένων μονοτερπενίων, 1,8-κινεόλη, θουγιόνη και καμφορά, που αφθονούν στα αιθέρια έλαια [39]. Σε άλλη μελέτη του ίδιου Πανεπιστημίου το 2019, αποδείχθηκε η ισχυρή αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων του φυτού έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*, ενός ισχυρά ανθρωπίνου παθογόνου βακτηρίου το οποίο είναι υπεύθυνο για διάφορες νοσοκομειακές λοιμώξεις. Η αποτροπή ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού, αποδόθηκε στην παρουσία φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα, οι οποίες έχουν αποδείξει προηγουμένως την ισχυρή τους αντιμικροβιακή δράση [41]. Επιπλέον, εκχυλίσματα της *S. officinalis* έχει αποδειχθεί πως επιδρούν και σε βακτήρια υπεύθυνα για διάφορες περιοδοντικές λοιμώξεις ενώ στην περίπτωση αυτή υπογραμμίζεται πως η μανόλη είναι το συστατικό με τον καθοριστικό ρόλο στη δράση αυτή [42].

1.3.3. *Primula veris*

1.3.3.i Χαρακτηριστικά

Μεταξύ των φυτών που διαθέτουν φαρμακευτικές ιδιότητες είναι και η *Primula veris* ή αλλιώς *Primula officinalis* με την κοινή ονομασία πρίμουλα. Η *Primula* πήρε το όνομά της από τη λατινική λέξη *primus* που σημαίνει «πρώτος» καθώς ανθίζει στις αρχές της άνοιξης. Η περίοδος ανθοφορίας είναι από τον Απρίλιο μέχρι το Μάιο ενώ οι ρίζες του φυτού εξάγονται κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Άλλα ονόματα με τα οποία είναι γνωστή η *Primula* είναι Πασχαλούδα, Παναγίτσα ή Δρακάκι. Η *Primula* από βοτανική άποψη ανήκει στην οικογένεια των *Primulaceae* ενώ από μόνη της σα γένος αποτελείται από 400 έως 500 είδη. Συναντάται σε όλη την εύκρατη Ευρώπη καθώς και στην Ασία.

Εντοπίζεται σε εκτάσεις πλούσιες σε βότανα και στις άκρες και σε ξέφωτα ζεστών και φωτεινών δασικών εκτάσεων [43, 44].

Πρόκειται για ένα φυτό με ποώδη φύλλα χαμηλά αναδύομενο που μπορεί να φτάσει σε ύψος μέχρι 20 με 30 εκατοστά. Τα άνθη της ξεχωρίζουν για το έντονο κίτρινο χρώμα τους, ενώ στην άκρη κάθε λοβού εμφανίζονται πορτοκαλί κηλίδες. Αυτά φαίνεται να ομαδοποιούνται όλα μαζί σε σχήμα που μοιάζει με ομπρέλα και κοιτάνε όλα προς την ίδια πλευρά. Η *Primula* έχει χονδρό μίσχο, σκούρα, διακλαδιζόμενη ρίζα και ο καρπός του είναι κάψα (Εικόνα 14). Ο συνδυασμός αυτού του πορτοκαλί με το έντονο κίτρινο και πράσινο χρώμα των στελεχών και των φύλλων το καθιστά μία πολύ καλή επιλογή για διακόσμηση, ενώ συνήθως τοποθετείται και ως βασικό φυτό σε πολλούς κήπους αφού το ύψος του δεν είναι πολύ υψηλό [45, 46].



Εικόνα 14: Άνθη *Primula veris* [46].

1.3.3.ii Δραστικές ουσίες

Οι κύριες δραστικές ενώσεις στα άνθη και τις ρίζες της *P. veris* είναι οι τριτερπενικές σαπωνίνες καθώς και οι φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των φαινολικών γλυκοζιτών. Οι σαπωνίνες είναι υπεύθυνες

για την βλεννολυτική και αποχρεμπτική δράση. Με τη σειρά τους, οι φαινολικές ενώσεις αποκαλύπτουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και κυτταροστατικές ιδιότητες [47].

Βάση ερευνών η συνολική περιεκτικότητα των φλαβονοειδών φτάνει περίπου το 3% και εντοπίζεται στα άνθη του φυτού. Μέχρι σήμερα σημαντικότερες ενώσεις φλοβανοειδών που έχουν ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα της *P. veris* είναι η κερκετίνη, η καμπφερόλη, η ρουτοσίδη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, καθώς και ορισμένες μεθοξυλιωμένες φλαβόνες. Η ρουτοσίδη ανήκει στην κατηγορία γλυκοζιτών και αποτελεί συνδυασμό της κερκετίνης και της ρητίνης, δύο φαινολικών παραγώγων που εντοπίζονται στα περισσότερα φυτά με αποδεδειγμένη ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Είναι γνωστή για το ισχυρό αντιοξειδωτικό της δυναμικό καθώς και για τις αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την εφαρμογή του φυτού στη θεραπεία του βήχα και των ασθενειών της αναπνευστικής οδού [47].

Στην κατηγορία των φαινολικών γλυκοζιτών ανήκουν η πριμβεροσίδη και η πριμουλαμπερισίδη οι οποίες όπως έχει αποδειχθεί είναι υπεύθυνες για την οσμή που εμφανίζει το φυτό κατά τη διαδικασία της ξήρανσης. Οι δύο αυτές ενώσεις εντοπίζονται μόνο στις ρίζες του φυτού και όχι στα άνθη [47].

Στο αιθέριο έλαιο της *P. veris* εντοπίζεται το γ-λινολεϊκό οξύ μία ένωση που φαίνεται να εμφανίζει ισχυρή ικανότητα έναντι της θεραπείας του διαβήτη. Ακόμη περιέχονται διάφορες αλκοόλες, στερόλες, υδρογονάνθρακες και τοκοφερόλες, με τις στερόλες να έχουν χρησιμοποιηθεί για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και για τη μείωση της χοληστερόλης. Οι φυτοστερόλες που υπάρχουν στην *P. veris* έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [48].

1.3.3.iii Φαρμακευτική δράση

Το φυτό της *Primula* είναι ένα ελάχιστα χρησιμοποιούμενο αλλά ένα εξαιρετικά φαρμακευτικό βότανο. Τα διάφορα είδη του γένους της *Primula* έχουν ένα πολύ εκτεταμένο ιστορικό παραδοσιακών χρήσεων και έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη θεραπεία καταστάσεων όπως οι κράμπες, η παράλυση, ο ρευματικός πόνος αλλά και για την καταπολέμηση της αϋπνίας. Μία κύρια δράση του είναι η καταπραϊντική αφού δρα άμεσα στο νευρικό σύστημα και βοηθά στην καταπολέμηση του άγχους και του στρες. Το ρόφημα που παρασκευάζεται από αυτά τα φυτά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της καταρροής, του βήχα, της βρογχίτιδας, της πνευμονίας, της νευραλγίας, του πονοκεφάλου, της εφίδρωσης, των ρευματισμών και της ουρικής αρθρίτιδας. Τα φύλλα της *Primula* είναι γνωστά ως φάρμακο κατά των ανοιχτών πληγών και για την αντιμετώπιση των μολώπων καθώς διαθέτουν αντισυπτικές ιδιότητες. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα που προορίζονται για από του στόματος χρήση, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της διάρροιας, του πόνου στο στόμα και της εσωτερικής αιμορραγίας [46,49].

Έχει αναφερθεί πως η παρουσία των φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα ή το αιθέριο έλαιο του φυτού υποδεικνύει ισχυρές αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Υπάρχουν διάφορες έρευνες αναφερόμενες στην αντιμικροβιακή δράση του γένους της *Primula* οι οποίες φαίνεται να διαφέρουν για το κάθε είδος. Σύμφωνα με μία έρευνα που διεξήχθη το 2009 στο Τμήμα Φαρμακευτικών Επιστημών πανεπιστημίου στο Πακιστάν αποδείχθηκε πως το εκχύλισμα του φυτού *Primula macrophylla* δεν κατέδειξε καμία αντιβακτηριακή δράση [50]. Αντίθετα, σε άλλη έρευνα στο Τμήμα Μικροβιολογίας του ίδιου πανεπιστημίου αποδείχθηκε πως εκχυλίσματα από το φυτό *Primula vulgaris* ασκούν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών όπως η

Escherichia coli και η *Pseudomonas aeruginosa* [44]. Σε μία νέα έρευνα στο Τμήμα Βοτανολογίας του ίδιου πανεπιστημίου το 2021, αποδείχθηκε πως τέσσερα διαφορετικά είδη της *Primula* (*P. denticulata*, *P. rosea*, *P. stuartii*, *P. elliptica*) δείχνουν αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση, χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση διαφορετικό εκχύλισμα, μεθανολικό, αιθανολικό ή υδατικό, και διαφορετικό μέρος του φυτού, άνθη, ρίζα ή φύλλα. Ωστόσο επισημαίνεται πως θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί η ακριβής μέθοδος δράσης με την οποία τα διάφορα εκχυλίσματα ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση [49].

Μέχρι τώρα δεν έχει διεξαχθεί προηγούμενη μελέτη που να αναφέρεται στην αντιμικροβιακή δράση της *P. veris* στην οποία επικεντρώνεται η παρούσα εργασία.

1.3.4. *Daphnes oleoides*

1.3.4.i Χαρακτηριστικά

Η *Daphne oleoides* χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων εδώ και πολλά χρόνια χάριν στην πληθώρα βιοδραστικών χημικών ουσιών που διαθέτει. Το γένος *Daphne* ανήκει στην οικογένεια *Thymeleaceae* και περιέχει πάνω από 70 είδη που απαντώνται στην Ασία, την Ευρώπη και περιοχές της Βόρειας Αφρικής. Εντοπίζεται σε βραχώδεις θέσεις στην αλπική ζώνη σε όλη την ορεινή ηπειρωτική Ελλάδα και Κρήτη, σε ξέφωτα δασών, θαμνώδεις εκτάσεις και σε υψόμετρα πάνω από 900 μέτρα [51].

Η *D. oleoides* είναι ένας αειθαλής, μικρός θάμνος, ύψους μόλις 40-70 εκατοστά, με στριφτά, εύκαμπτα και ανθεκτικά κλαδιά. Τα φύλλα της είναι ωοειδή, σαρκώδη και γυαλιστερά από πάνω, συνήθως χωρίς μίσχους και διατεταγμένα ως επί το πλείστον

εναλλάξ. Τα άνθη της έχουν λευκό χρώμα, έντονο άρωμα και διαθέτουν τέσσερις λοβούς με αιχμηρή άκρη που φύονται ανά 3 έως 6 σε επάκριες δέσμες μήκους 10-15 mm (Εικόνα 15). Η περίοδος ανθοφορίας του φυτού ξεκινάει από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούλιο [52, 53].



Εικόνα 15: Άνθη *Daphnes. oleoides* [51].

Ωστόσο αξίζει να τονιστεί πως πρόκειται για ένα δηλητηριώδες φυτό. Το γένος *Daphne* με κάθε είδος του αναφέρεται ως τοξικό. Όλα τα μέρη του φυτού είναι τοξικά αλλά ιδιαίτερα τα μούρα. Τα μούρα όταν ωριμάσουν είναι έντονα κόκκινα και πιστεύεται ότι αποτελούν ιδιαίτερο κίνδυνο ακόμη και σε χαμηλές σε γραμμάρια δόσεις, κυρίως για τα παιδιά [54].

Τα κύρια τοξικά συστατικά του φυτού είναι οι κουμαρίνες όπως η δαφνίνη, που είναι από τα πιο κοινά στο γένος και τα διτερπένια δαφνάνης όπως η μεζερεΐνη και η δαφνετοξίνη. Τα συμπτώματα της κατάποσης φυτού *Daphne* περιλαμβάνουν κάψιμο στο λαιμό και στο στομάχι, ναυτία, έμετο, γαστρεντερίτιδα, εσωτερική αιμορραγία, αιματηρή διάρροια, σπασμούς, παράλυση, νεφρική διαταραχή, βραδυκαρδία, ακόμη και κυκλοφορική

διακοπή. Ακόμη, σε περίπτωση επαφής με το δέρμα μπορεί να προκαλέσει μέχρι και ερεθισμό [54].

1.3.4.ii Δραστικές ουσίες

Από το φυτό αυτό έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός χημικών ενώσεων οι οποίες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων που έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται κουμαρίνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες και τερπενοειδή [54].

Οι κουμαρίνες είναι από τις πιο άφθονες ενώσεις στην *D. oleoides*. Μία από τις πρώτες κουμαρίνες που απομονώθηκαν ήταν η δαφνίνη που πήρε το όνομά της από το φυτό, ενώ ακόμη έχουν βρεθεί διάφορες μονομερείς, διμερείς και τριμερείς κουμαρίνες. Πάνω από πενήντα διαφορετικές κουμαρίνες και οι γλυκοσίδες τους έχουν αναφερθεί από το γένος *Daphne* μέχρι στιγμής. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες έχουν δείξει μια ποικιλία δραστηριοτήτων όπως κυτταροτοξική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη [54].

Πάνω από 100 διαφορετικά φλαβονοειδή έχουν εντοπιστεί στο γένος *Daphne*, μεταξύ των οποίων σημαντικότερα είναι η λουτεολίνη, η καμπφερόλη και η κερκετίνη. Αυτά περιλαμβάνουν φλαβονόλες, μεθοξυφλαβονοειδή, βιοφλαβονοειδή και τους γλυκοζίτες τους. Οι δαφνοδορίνες και παρόμοια βιοφλαβονοειδή είναι ειδικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που υπάρχουν στην οικογένεια *Thymelaeaceae* και στο γένος *Daphne*, που περιέχουν λειτουργικές ομάδες βενζοφουράνιου ή βενζοπυράνης και έχουν καταδείξει πολυάριθμα βιολογικά αποτελέσματα [53, 54].

Μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί πάνω από 30 λιγνάνες από αυτό το γένος, με πιο κοινές εκείνες τύπου φουροφουράνης. Άλλοι τύποι περιλαμβάνουν τους τύπους φουρανίου,

διβενζυλβουτανίου, διβενζυλβουτυρολακτόζης, διβενζυλβουτυρολακτόνης, καθώς και αρκετές σεκολινάνες και μία νεολιγνάνη. Αρκετές από αυτές τις ενώσεις έχουν δείξει αντιφλεγμονώδη, αντική και κυτταροτοξική δράση. [54].

Τα τερπενοειδή είναι από τα κύρια χημικά συστατικά αυτού του γένους. Τα πρώτα διτερπένια τύπου δαφνάνης που απομονώθηκαν από αυτό το γένος ήταν η μεζερεΐνη. Η μεζερεΐνη και τα σχετικά διτερπένια δαφνάνης είναι χαρακτηριστικά συστατικά της οικογένειας Thymelaeaceae και του γένους *Daphne*, γεγονός που αποδίδεται στην τοξικότητά τους. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί έως και 120 τερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένων των σεσκιτερπενίων, των διτερπενίων και των τριτερπενίων. Πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν επιδείξει αρκετές σημαντικές βιολογικές επιδράσεις όπως κυτταροτοξικές, αντιπολλαπλασιαστικές, αντικές, αντιτροφοδοτικές, ανασταλτικές [54].

1.3.4.iii Φαρμακευτική δράση

Αν και τα είδη της *Daphne* έχουν αναγνωριστεί από καιρό για τις τοξικές τους επιδράσεις, αρκετά από αυτά έχουν επίσης τεκμηριωθεί για τα θεραπευτικά τους αποτελέσματα έναντι διαφόρων παθήσεων. Η *D. oleoides* είναι μια αποδεδειγμένα πλούσια πηγή μιας ποικιλίας μοναδικών και ενδιαφερόντων φυσικών προϊόντων με ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών ιδιοτήτων. Διαθέτει αποτελεσματικές θεραπευτικές ιδιότητες και για αυτό άλλωστε έχει χρησιμοποιηθεί σε φυτικά φάρμακα και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών [55].

Τόσο τα φύλλα όσο και οι ρίζες της *D. oleoides* χρησιμοποιούνται ήδη για τη θεραπεία της αρθρίτιδας, του αποστήματος, της διάρροιας, του ρευματισμού και της ελονοσίας. Η

δαφνίνη που εντοπίζεται σε αφθονία αποτελεί επίσης ένα δραστικό συστατικό που υποδεικνύει επολωτικές ιδιότητες πηλών. Διάφορα εκχυλίσματα και κλάσματα που λαμβάνονται από ολόκληρο το φυτό έχουν αναφερθεί ότι δείχνουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι κυτταροκινών που προέρχονται από μακροφάγα, όπως για παράδειγμα η ιντερλευκίνη-1α (IL-1α), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και παράγοντα νέκρωσης όγκου, ενώ διάφορα εκχυλίσματα αιθανόλης, μεθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα φαίνεται να έχουν ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό, με αποτέλεσμα να μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω η δράση αυτή για την πιθανή χρήση του φυτού ως φυσικό αντιοξειδωτικό. Τέλος η *D. oleoides* έχει ακόμη παρουσιάσει διεγερτικές και χαλαρωτικές επιδράσεις στο έντερο με τις φυτοχημικές μελέτες να αποκαλύπτουν πως η παρουσία της μεγάλης ποικιλίας των βιοδραστικών κουμαρινών και φλαβονοειδών που περιέχονται να είναι δυνητικά υπεύθυνες για αυτή τη δράση [55].

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση του φυτού έχουν γίνει διάφορες μελέτες αναφερόμενες σε σχετικούς μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με μία έρευνα που διεξήχθη το 2016 σε Πανεπιστήμιο της Τουρκίας βρέθηκε πως τόσο τα αιθέρια έλαια της *D. oleoides*, όσο και τα διάφορα εκχυλίσματα αιθανόλης, μεθανόλης, διγλωρομεθανίου, εξανίου και άλλων, κατέδειξαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των διαφόρων επιλεγμένων στελεχών συμπεριλαμβανομένων τόσο θετικών κατά Gram βακτηρίων, όσο και αρνητικών. Αποδείχθηκε πως τα εκχυλίσματα εκείνα με το υψηλότερο επίπεδο φλαβονοειδών ήταν και αυτά που ασκούσαν την ισχυρότερη δράση. Ωστόσο σημειώθηκε πως το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων του φυτού δεν άσκησε κάποια ανασταλτική δράση έναντι των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων [56]. Σε μία άλλη έρευνα του ίδιου Πανεπιστημίου βρέθηκε επίσης πως τα αιθέρια έλαια της *D. oleoides* κατέδειξαν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι των επιλεγμένων στελεχών

συμπεριλαμβανομένων τόσο θετικών κατά Gram βακτηρίων, όσο και αρνητικών. Οι ερευνητές απέδειξαν πως η δράση αυτή οφείλεται στις κουμαρίνες και στα φλαβονοειδή που εντοπίζονται στο φυτό [57].

1.3.5. Αιθέρια έλαια φαρμακευτικών φυτών

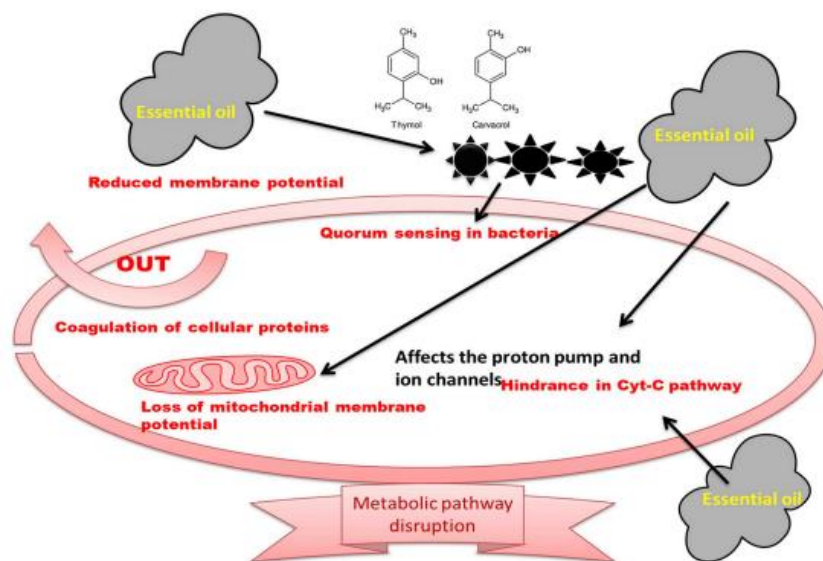
Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός αιθέριων ελαίων και τα συστατικά τους έχουν διερευνηθεί για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες έναντι ορισμένων βακτηρίων και μυκήτων σε περισσότερες από 500 αναφορές. Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικά μίγματα πτητικών ουσιών που απομονώνονται φυσικά με τη μέθοδο της απόσταξης. Αυτά παράγονται από μέρη φυτών ως δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως άνθη, μπουμπούκια, μίσχοι, φύλλα, σπόροι, κλαδιά, ρίζες και ξύλο. Τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, αλκοολών, αιθέρων, αλδεϋδών και κετονών τα οποία είναι υπεύθυνα για τις αρωματικές και βιολογικές ιδιότητες που εμφανίζουν. Τα αιθέρια έλαια θεωρούνται ως σημαντική πηγή σε διάφορους τομείς όπως οι βιομηχανίες καλλυντικών, αρωμάτων και φαρμακευτικών προϊόντων. Σήμερα υπάρχουν περίπου 3000 καθιερωμένα αιθέρια έλαια, μερικά εκ των οποίων είναι σημαντικά ειδικά για τρόφιμα, είδη υγιεινής, αρώματα, προϊόντα μακιγιάζ ως αρώματα, προϊόντα καθαρισμού οικιακής χρήσης και ως βιομηχανικοί διαλύτες, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και για στοματικές και οδοντιατρικές θεραπείες. Λόγω του αρώματος και των βιολογικών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων, έχουν ένα τεράστιο υποσχόμενο δυναμικό στην παγκόσμια αγορά [58].

Στην ιατρική, τα αιθέρια έλαια έχουν ερευνηθεί εκτενώς για τις αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντικές, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους.

Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια που έχουν αντιμικροβιακές δραστηριότητες έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών επιστημονικών αναφορών με αποτέλεσμα τον έλεγχο μιας ευρείας ποικιλίας φυτικών ειδών. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των φυσικών προϊόντων είναι ότι δεν ενισχύουν την αντοχή στα αντιβιοτικά όπως φαίνεται να συμβαίνει με τη μακροχρόνια έκθεση σε συνθετικά αντιβιοτικά. Από την άλλη πλευρά, η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων που είναι υπεύθυνη για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διάφορους παράγοντες όπως οι κλιματολογικές και γεωγραφικές συνθήκες καθώς και η συγκομιδή, οι τεχνικές απομόνωσης και η αποθήκευση. Αυτοί οι παράγοντες παρεμβαίνουν στις μελέτες, καθώς τα αποτελέσματα επηρεάζονται από αυτούς, καθιστώντας έτσι δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων ή συγκρίσεων [59].

Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης. Η αντιμικροβιακή αυτή ιδιότητα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τα χημικά συστατικά και την ποσότητα των κύριων μεμονωμένων ενώσεων που περιέχονται σε κάθε διαφορετική σύνθεση. Κάθε ένωση μπορεί να εμφανίζει διαφορετικό μηχανισμό αντιβακτηριακής δράσης μέσω μιας σειράς βιοχημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων μπορεί να διαφέρει και λόγω της διαφορετικής βακτηριακής αρχιτεκτονικής, όπως το Gram θετικό και το Gram αρνητικό βακτήριο, τα οποία διαφέρουν ως προς την κυτταρική τους μεμβράνη. Έχει προταθεί πως τα αιθέρια έλαια οδηγούν σε αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος γεγονός που επιτρέπει την αυξημένη διαπερατότητα, η οποία διαταράσσει πολλές κυτταρικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ενέργειας, της μεταφοράς μεμβράνης και άλλων μεταβολικών ρυθμιστικών λειτουργιών.

Τα αιθέρια έλαια μπορεί να επηρεάσουν τόσο το εξωτερικό περίβλημα του κυττάρου όσο και το κυτταρόπλασμα. Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, τα αιθέρια έλαια είναι εύκολα διαπερατά μέσω των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών. Οι λιπόφιλες ενώσεις μπορούν να διέλθουν από το κυτταρικό τοίχωμα και να καταστρέψουν τους πολυσακχαρίτες, τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια, κάνοντάς τα τελικά διαπερατά. Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται ένας πιθανός μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, η καρβακρόλη μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση της μαστιγίνης, μιας πρωτεΐνης που ρυθμίζει την κινητικότητα των βακτηρίων. Το φαινυλοπροπένιο, η ευγενόλη, παρουσιάζει επίσης δράση τροποποιώντας το περίγραμμα των λιπαρών οξέων για να αλλάξει την κυτταροπλασματική μεμβράνη διαφορετικών βακτηρίων. Ωστόσο, απαιτείται διευκρίνιση σχετικά με τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης κάθε αιθέριου ελαίου και των συστατικών του, ενώ ταυτόχρονα η λεπτομερής μελέτη των συστατικών των αιθέριων ελαίων θα ήταν χρήσιμη για την κατανόηση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής τους δράσης [58,60].



Εικόνα 16: Πιθανή σχηματική απεικόνιση αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής δράσης [58].

Οι ειδικές βιολογικές ιδιότητες και το άρωμα των αιθέριων ελαίων οφείλονται στα τερπένια και τις φαινολικές ενώσεις που αποτελούν βασικά συστατικά των αιθέριων ελαίων. Τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από φαρμακευτικά αρωματικά φυτά αναφέρονται ότι είναι αποτελεσματικά έναντι ιών, αρνητικών κατά Gram και θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και μυκήτων [58]. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από διάφορα φαρμακευτικά φυτά έναντι του *Staphylococcus aureus*, γνωστό παθογόνο βακτήριο, υπεύθυνο για διάφορες νοσοκομειακές λοιμώξεις [59]. Επιπλέον, αποτελέσματα πολλών ερευνών μπόρεσαν να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα των αιθέριων ελαίων έναντι βακτηρίων όπως η *Escherichia coli*, η *Salmonella typhi* και η *Pseudomonas aeruginosa* [58, 61].

Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη ισχυρές ενδείξεις πιθανής κλινικής χρήσης για τα αιθέρια έλαια. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθοριστεί εάν θα μπορούσαν τελικά να

αντικαταστήσουν αποτελεσματικά τα συνθετικά αντιβιοτικά ή ίσως να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό, όπως προτείνουν άλλοι ερευνητές.

1.4 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

Οι φαρμακευτικές επιστήμες στο πλαίσιο των τεχνολογικών εξελίξεων, παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των προϊόντων της νανοτεχνολογίας. Ως νανοτεχνολογία, ορίζεται η επιστήμη εκείνη η οποία βρίσκει εφαρμογή σε εξαιρετικά μικρές διαστάσεις, στη νανοκλίμακα, δηλαδή στην κλίμακα διαστάσεων από 1 έως 100nm. Η γνώση της νανοτεχνολογίας είναι εφαρμόσιμη από τους μικροοργανισμούς στο ανθρώπινο σώμα και την ιατρική μέχρι τον τομέα στις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων καθώς και γεωργίας, γεγονός που επέφερε «επανάσταση» στη ζωή της ανθρωπότητας [62].

Η σύνθεση νανოსωματιδίων (Nano Particles, NPs) από μέταλλα έχει αποκτήσει τεράστιο ενδιαφέρον λόγω της ποικίλης εφαρμογής τους σε διάφορους τομείς, όπως η θεραπεία του καρκίνου, η παρασκευή φαρμάκων, η ασφάλεια των τροφίμων, η χημεία και η φωτοκατάλυση, καθώς και λόγω των αντικαρκινικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Οι χρήσεις των νανοςωματιδίων στα διάφορα πεδία είναι δυνατές λόγω του μεγέθους και της εφαρμογής τους σε διάφορους κλάδους των επιστημών που ωφελούν την ανθρωπότητα [63].

Διάφορες προσεγγίσεις, χημικές, φυσικές και βιολογικές, αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των διαφόρων τύπων νανοςωματιδίων. Οι φυσικές και χημικές τεχνικές σύνθεσης απαιτούν επιφανειοδραστικές ουσίες, διαλύτες και αναγωγικούς παράγοντες που έχουν δυνητικά βιολογικά προβλήματα. Έτσι, λόγω της

τοξικότητας και του περιβαλλοντικού ασυμβίβαστου αυτών των μεθόδων, υπάρχει ανάγκη για «πράσινη», φιλική προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτική και αποτελεσματική νανοτεχνολογία για την παραγωγή των νανοσωματιδίων. Η πράσινη νανοτεχνολογία αναπτύσσεται με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανοί κίνδυνοι προς το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία, αφού αυτές οι μέθοδοι δεν απαιτούν χρήση υψηλής πίεσης, ενέργειας, θερμοκρασίας και τοξικών χημικών αντιδραστηρίων. Στο πλαίσιο της «πράσινης» χημείας, έχει αναπτυχθεί μια διαδικασία ενσωμάτωσης των μεταλλικών νανοσωματιδίων σε φυτικά εκχυλίσματα. Τα φυτά και τα παράγωγα των εκχυλισμάτων τους χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή νανοσωματιδίων, καθώς διαθέτουν διάφορα βιομόρια με καρβοξυλικές και υδροξυλικές ομάδες που μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες για την αναγωγή των ιόντων του μετάλλου καθώς και ως σταθεροποιητές. Όχι μόνο τα φύλλα του φυτού, αλλά και άλλα τμήματα αυτού όπως οι ρίζες, ο φλοιός, ο καρπός, οι φλούδες, έχουν εφαρμοστεί σε διαφορετικά σχήματα και μεγέθη για τη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων. Η βιολογική χρήση των μετάλλων στον κλάδο της νανοτεχνολογίας παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων είναι γνωστή ήδη από τις αρχές του 1900 [63, 64].

Ο μηχανισμός σύνθεσης των νανοσωματιδίων μετάλλων παρουσία φυτικού εκχυλίσματος περιλαμβάνει πρόσληψη ηλεκτρονίων και αναγωγή του μετάλλου από την οξειδωτική του κατάσταση στην ελεύθερη κατάσταση. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται χάρη στην παρουσία λειτουργικών ομάδων που περιέχονται στο εκχύλισμα φυτού, όπως οι υδροξυλομάδες που εμφανίζονται σε όλες τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων για τη μετατροπή του συμπλόκου μετάλλου στο ελεύθερο μέταλλο, ενώ ακόμη έχουν και ρόλο σταθεροποιητικό [65].

1.4.1. Φαρμακευτική δράση νανοσωματιδίων

1.4.1.i Αντικαρκινική δράση

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, έχει αναφερθεί πως τα συντιθέμενα νανοσωματίδια μετάλλων με φυτικά υλικά έχουν τεράστιο αντικαρκινικό δυναμικό, καθώς έχουν δείξει ισχυρή τοξική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων. Τα βιοσυνθετικά NPs εμφανίζουν χαρακτηριστικές αντικαρκινικές δραστηριότητες, χάρη στην πληθώρα των βιομορίων που διαθέτουν τα φυτά, τα οποία μπορούν εύκολα να προσροφηθούν στις επιφάνειες των NPs καθιστώντας τα αποτελεσματικότερα από άλλα συνθετικά υλικά όσον αφορά την αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων [65].

Σε πρόσφατη έρευνα των S. Adewale Akintelu et al, νανοσωματίδια χρυσού, AuNPs, σε συνδυασμό με φυτικό εκχύλισμα, προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο σε ποσοστό 60% έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7). Ακόμη, η αποτελεσματικότητα των AuNPs αποδείχθηκε και έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A431 του καρκίνου του δέρματος καθώς κατέδειξαν επιλεκτική τοξικότητα, γεγονός που τα καθιστά έναν καλό αντικαρκινικό παράγοντα. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η αντικαρκινική απόδοση των AuNPs εξαρτάται από τον σταθεροποιητικό παράγοντα, δηλαδή το φυτικό υλικό που χρησιμοποιείται κάθε φορά και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων [65].

1.4.1.ii Αντιβακτηριακή δράση

Οι S. Adewale Akintelu et al, αποκάλυψαν ακόμη σημαντική αντιβακτηριακή δράση των AuNPs παρουσία φυτικού εκχυλίσματος έναντι της ανάπτυξης των *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*, δύο δυνητικά παθογόνων, αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η

πράσινη σύνθεση των AuNPs χρησιμοποιώντας εκχύλισμα φύλλων φυτού κατέδειξε σημαντικό αντιβακτηριακό δυναμικό καθιστώντας τα AuNPs έναν πολλά υποσχόμενο αντιμικροβιακό παράγοντα. Επιπλέον, οι ερευνητές απέδειξαν πως τα AuNPs με το φυτικό εκχύλισμα παρουσίασαν αποτελεσματικότερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τα χημικά συντιθέμενα AuNPs, μία διαπίστωση η οποία αποδόθηκε στη συνεργιστική επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων με τα νανοσωματίδια [65]. Σε μία άλλη μελέτη από τους M.B. Lava et al το 2020, βρέθηκε πως νανοσωματίδια αργύρου, AgNPs, παρουσία φυτικού εκχυλίσματος κατέδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων *Micrococcus luteus* και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *Escherichia coli* [62]. Οι Gloria E. Campillo et al, επίσης απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση των AgNPs έναντι μεσόφιλων μικροοργανισμών, κατά τους οποίους η χαμηλότερη συγκέντρωση που ανέστειλε πλήρως την ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν 20% [66]. Σε άλλη μελέτη των Muhammad Riaz et al το 2021 αποδείχθηκε εξίσου η αντιβακτηριακή δράση των AgNPs έναντι του *Staphylococcus aureus* και της *Escherichia coli*, ενός Gram θετικού και ενός Gram αρνητικού βακτηρίου αντίστοιχα [67].

1.4.2. Νανοσωματίδια αργύρου, AgNPs

Ο άργυρος παρουσιάζει εντυπωσιακές ιδιότητες υλικού και είναι ένας χαμηλού κόστους και άφθονος φυσικός πόρος. Τα AgNPs, έχουν διερευνηθεί εκτενώς λόγω των φυσικών, χημικών και βιολογικών χαρακτηριστικών τους, τα οποία αποδίδονται στο μέγεθος, το σχήμα, τη σύνθεση, την κρυσταλλικότητα και τη δομή τους, καθώς επίσης και την ιδιότητα τους να μπορούν να τροποποιηθούν με διάφορες συνθετικές μεθόδους, αναγωγικούς παράγοντες και σταθεροποιητές [68].

Στην καθημερινότητά μας, πολλά από τα προϊόντα ευρείας χρήσης περιέχουν νανοϋλικά που αποτελούνται από AgNPs. Μερικά παραδείγματα αυτών είναι ηλεκτρονικοί υπολογιστές, κινητά τηλέφωνα, συσκευές αυτοκινήτων, υλικά συσκευασίας τροφίμων, συμπληρώματα διατροφής, οικιακές συσκευές, ιατρικές συσκευές, απολυμαντικά για το νερό και το περιβάλλον και άλλα [69].

Διάφορες μελέτες εντοπίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο αντιμικροβιακό δυναμικό των AgNPs και συγκεκριμένα αυτών που συντίθενται με εκχυλίσματα φυτών, αφού η πλειονότητα των στρατηγικών σύνθεσης έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μιας φιλικής προς το περιβάλλον προσέγγισης, για πιο οικονομικά και περισσότερο αποδοτικά αποτελέσματα. Έχει επανειλημμένως διαπιστωθεί ότι τα AgNPs που παρασκευάζονται με φυτικά εκχυλίσματα εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων βακτηρίων, τόσο θετικών κατά Gram, όσο και αρνητικών κατά Gram, οι οποίες αποδίδονται στις διάφορες τερπενικές και πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα διάφορα τμήματα των φυτών. Οι ενώσεις αυτές, πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την αναγωγή των ιόντων αργύρου από Ag^+ σε Ag^0 και τη σταθεροποίηση των νανოსωματιδίων στα κύτταρα. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν και αποτελεσματικά μυκητοκτόνα, καθώς φαίνεται πως μπορούν να εξοντώσουν έναν αριθμό συνήθων μυκητικών στελεχών [69, 70].

Σήμερα, τα νανოსωματίδια είναι ένα σημαντικό πεδίο σύγχρονης έρευνας και η χρήση τους σε διάφορους τομείς αυξάνει ολοένα και περισσότερο την ανάγκη παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα. Η βιολογική αυτή σύνθεση νανοςωματιδίων εφιστά την προσοχή σε πολλούς κλάδους της επιστήμης, ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, λόγω της ασφάλειάς της αφού χρησιμοποιούνται φυσικοί παράγοντες και μη τοξικές χημικές ουσίες.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης υδατικών εκχυλισμάτων τεσσάρων φαρμακευτικών φυτών τα οποία συλλέχθηκαν στην Ήπειρο: του *Cistus incanus*, της *Salvia officinalis*, της *Primula veris* και της *Daphnes oleoides*. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση εξετάστηκε και ως προς νανοσωματίδια αργύρου τα οποία συντέθηκαν με βάση τα φυτικά αυτά εκχυλίσματα καθώς επίσης και το μίγμα αυτών προκειμένου να ελεγχθεί πιθανή συνεργιστική δράση. Η έρευνα της πιθανής δράσης τόσο των φυτικών εκχυλισμάτων, όσο και των νανοσωματιδίων αργύρου αυτών πραγματοποιήθηκε σε μικροβιακές καλλιέργειες γνωστών ανθρωπίνων παθογόνων τα οποία έχουν εμφανίσει κατά καιρούς πολλαπλή ανθεκτικότητα σε κοινά αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα της έρευνας χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση με τα αποτελέσματα που εμφανίζουν αντιβιοτικά φάρμακα σε διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις προκειμένου να εξεταστεί η ενδεχόμενη αντικατάσταση των αντιβιοτικών με φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων και νανοσωματιδίων αργύρου

- ✓ Συλλογή φυτών
- ✓ Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων
- ✓ Παρασκευή AgNPs παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων και γαλακτώματος AgNPs

3.1.1. Συλλογή φυτών

Τα τέσσερα επιλεγμένα φυτά, *Cistus incanus*, *Salvia officinalis*, *Primula veris* και *Daphnes oleoides*, συλλέχθηκαν εντός της περιόδου ανθοφορίας τους, δηλαδή κατά την ανοιξιάτικη περίοδο. Αμέσως μετά τη συγκομιδή, οι ρίζες, τα φύλλα και τα άνθη των φυτών αφέθηκαν να ξηραθούν σε σκιερό μέρος για μερικές ημέρες.

3.1.2. Παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων

4g κάθε φυτού συμπεριλαμβανομένων των φύλλων και των ριζών, ζυγίστηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 50ml νερό. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Soxhlet, κατά την οποία όλες οι βιοδραστικές ουσίες που περιέχονται στα διάφορα φυτά μεταφέρονται στο διάλυμα. Τα φυτικά εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για την αποφυγή επιμόλυνσης.

3.1.3. Παρασκευή AgNPs παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων

Για την παρασκευή των AgNPs παρουσία των φυτικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν 10ml από τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν προηγουμένως και αναμίχθηκαν με διάλυμα νιτρικού αργύρου, AgNO_3 και 40 ml απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την ανάμιξη, το χρώμα του διαλύματος αλλάζει υποδεικνύοντας έτσι την παρουσία του στοιχειακού αργύρου [70]. Με την επαναλαμβανόμενη έκπλυση του ιζήματος με το νερό, απομακρύνεται κάθε ίχνος ιόντων αργύρου που πιθανό να έχει επικαθίσει στο δοκιμαστικό σωλήνα αφού το διάλυμα του AgNO_3 είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτό. Τα διάφορα διαλύματα αφέθηκαν για ξήρανση υπό τη βοήθεια κενού.

Αφού πλέον είχαν απομείνει μόνο τα στερεά AgNPs των εκχυλισμάτων, επαναδιαλύθηκαν σε ποσότητα διμεθυλοσουλφοξειδίου, DMSO, για την παρασκευή του γαλακτώματος που θα χρησιμοποιούνταν κατά την μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Η ποσότητα του DMSO που χρησιμοποιήθηκε ήταν κάθε φορά τόση ώστε η συγκέντρωση του τελικού γαλακτώματος να αντιστοιχεί σε 2mg/ml. Δηλαδή, σε κάθε περίπτωση, αφού ζυγίστηκε η ποσότητα των AgNPs έπειτα προσδιορίστηκε η κατάλληλη ποσότητα DMSO ούτως ώστε το διάλυμα να φτάσει σε τελική συγκέντρωση 2mg/ml. Για την καλύτερη διαλυτοποίηση των AgNPs στο διαλύτη του DMSO, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή υπερήχων για λίγα λεπτά.

3.2 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης

- ✓ Δοκιμή επιλογής ιδανικού θρεπτικού υλικού
- ✓ Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων
- ✓ Agar diffusion method
- ✓ Δοκιμή επίδρασης διαλύτη DMSO

Η πιθανή αντιμικροβιακή δράση τόσο των φυτικών εκχυλισμάτων όσο και των AgNPs αυτών, ελέγχθηκε έναντι 10 συνολικά βακτηρίων εκ των οποίων τα πέντε από αυτά είναι εργαστηριακά στελέχη: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ τα υπόλοιπα πέντε είναι απομονωμένα στελέχη από τη λίμνη Παμβώτιδα και χαρακτηρισμένα μερικώς προηγουμένως: *Chryseobacterium luteum*, *Acinetobacter parvus*, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Pedobacter*. Συνολικά μελετήθηκαν τρία Gram θετικά και επτά Gram αρνητικά βακτήρια. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια ανήκουν τα *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Micrococcus luteus*, ενώ στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων κατατάσσονται τα *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pedobacter roseus*, *Chryseobacterium luteum*, *Acinetobacter parvus* και *Stenotrophomonas rhizophila*.

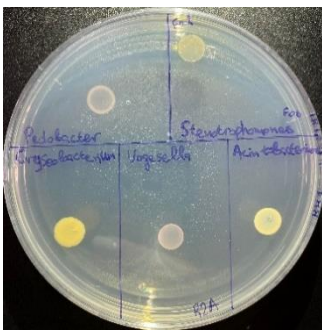
3.2.1 Δοκιμή επιλογής ιδανικού θρεπτικού υλικού

Για την επιλογή του ιδανικού θρεπτικού υλικού κάθε απομονωμένης από τη λίμνη Παμβώτιδα καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε στερεή καλλιέργεια σε διάφορα θρεπτικά υλικά (Nutrient agar, Tryptic Soy agar, LB agar, R2A) με την προσθήκη μικρής ποσότητας, περίπου 8μl, αρχικής καλλιέργειας στην επιφάνεια αυτών και σε ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας. Για τα εργαστηριακά στελέχη που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Nutrient agar Tryptic Soy agar LB



R2A



Βάση των πειραματικών και βιβλιογραφικών πηγών προκύπτει ο εξής πίνακας:

Πίνακας 2: Ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης βακτηρίων

ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tryptic Soy broth	37°C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Nutrient broth	37°C
<i>Escherichia coli</i>	LB broth	37°C
<i>Aeromonas veronii</i>	LB broth	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LB broth	37°C
<i>Pedobacter roseus</i>	Nutrient broth	30°C
<i>Chryseobacterium luteum</i>	Tryptic Soy broth	30°C
<i>Acinetobacter parvus</i>	Tryptic Soy broth	30°C
<i>Micrococcus luteus</i>	Tryptic Soy broth	37°C
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Nutrient broth	30°C

3.2.2 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα τρία στερεά θρεπτικά υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Αυτά ήταν το Tryptic Soy agar, το Nutrient agar και το LB agar. Για την παρασκευή τους ακολούθηθηκε η εξής πειραματική πορεία:

Παρασκευή Tryptic Soy agar:

- Προσθήκη 1,7g tryptone, 0,3g soytone, 0,25g dextrose, 0,5g NaCl και 0,25g K_2HPO_4 σε τελικό όγκο 100ml απεσταγμένου νερού
- Ανάδευση για 10'
- Προσθήκη 1,5g agar
- Αποστείρωση στους 121°C για 15-20'
- Απόκτηση θερμοκρασίας 55°C σε υδατόλουτρο
- Διαμοιρασμός στα τρυβλία
- Αποθήκευση στους 4°C

Παρασκευή Nutrient agar:

- Προσθήκη 0,3g beef extract και 0,5g peptone σε τελικό όγκο 100ml απεσταγμένου νερού
- Ανάδευση για 10min
- Προσθήκη 1,5g agar
- Αποστείρωση στους 121°C για 15-20'
- Απόκτηση θερμοκρασίας 55°C σε υδατόλουτρο
- Διαμοιρασμός στα τρυβλία
- Αποθήκευση στους 4°C

Παρασκευή LB agar:

- Προσθήκη 1g tryptone, 0,5g yeast extract και 1g NaCl σε τελικό όγκο 100ml απεσταγμένου νερού
- Ανάδευση για 10min
- Προσθήκη 1,5g agar
- Αποστείρωση στους 121°C για 15-20'
- Απόκτηση θερμοκρασίας 55°C σε υδατόλουτρο
- Διαμοιρασμός στα τρυβλία
- Αποθήκευση στους 4°C

Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκαν και τα τρία υγρά θρεπτικά υλικά, το Tryptic Soy broth, το Nutrient broth και το LB broth, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακαλλιέργεια των βακτηρίων, με τη διαφορά ότι σε αυτά δεν προστέθηκε η ποσότητα του agar πριν το στάδιο της αποστείρωσης.

Έπειτα, τα βακτήρια, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C σε συγκέντρωση 20% γλυκερόλης, ανακαλλιεργήθηκαν σε 5ml θρεπτικό υλικό. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε η ποσότητα του θρεπτικού υλικού, 100μl από κάθε βακτήριο και επώαστηκαν στους 30 ή 37 °C, σύμφωνα με τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης όπως αναφέρονται στον Πίνακα 2, έως ότου φθάσουν τα πρότυπα θολερότητας, σε επωαστήρα στους 200rpm (rounds per minute).

Μετά από περίπου 24 ώρες, αφού αναπτύχθηκαν τα βακτήρια, ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων και των AgNPs αυτών, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο διάχυσης άγαρ (agar diffusion method).

3.2.3 Agar diffusion method

Η μέθοδος διάχυσης άγαρ (agar diffusion method), χρησιμοποιείται εκτενώς σε πολλά κλινικά εργαστήρια για την *in vitro* διερεύνηση εκχυλισμάτων και καθαρών φαρμάκων ως πιθανούς αντιμικροβιακούς παράγοντες [71]. Η τεχνική αυτή είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος εκτίμησης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας. Έχει κατά καιρούς αναγνωριστεί ως ακριβής και αξιόπιστη, παρά το γεγονός ότι προάγει μόνο ποιοτικά αποτελέσματα, όχι ποσοτικά και όχι πάντα επαναλαμβανόμενα. Ωστόσο καθιστά δυνατή την εκτίμηση του βαθμού αναστολής της ανάπτυξης μικροοργανισμών με απλό και γρήγορο τρόπο [72].

Κατά τη μέθοδο αυτή, αρχικά επιστρώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου 100μl καλλιέργειας και αφήνονται στον επωαστήρα για λίγα λεπτά ώστε να απορροφηθούν από το θρεπτικό υλικό. Στην περίπτωση της *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιούνταν 30μl αραιωμένα σε 70μl υγρού θρεπτικού LB (σύμφωνα με τον Πίνακα 2), διότι πρόκειται για ένα βακτήριο ιδιαίτερα παθογόνο και πολυανθεκτικό το οποίο κατά την ανάπτυξή του εμφανίζει σκούρο πράσινο χρώμα, γεγονός που θα απέτρεπε την ασφαλή παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Εν συνεχεία, σε κάθε τρυβλίο σχηματίζονται αντιδιαμετρικά τέσσερα φρεάτια διαμέτρου περίπου 6 mm με τη βοήθεια αποστειρωμένου tip, το οποίο βυθίζεται στο θρεπτικό υλικό και το κομμάτι που δημιουργείται αφαιρείται με μία αποστειρωμένη λαβίδα. Στις τέσσερις κοιλότητες που σχηματίζονται προστίθεται κάθε φορά διάλυμα τελικού όγκου 100μl. Σε μία πρώτη εργαστηριακή δοκιμή, στα τέσσερα φρεάτια προστέθηκαν 100μl εκχυλίσματος που αντιστοιχούν σε 8mg φυτού, 53,5μl γαλακτώματος AgNPs που αντιστοιχούν στην ίδια ποσότητα φυτού με το εκχύλισμα, δηλαδή σε 8mg φυτού και συμπληρώνονται με ποσότητα διπλά απεσταγμένου νερού, dd H₂O, έως ότου φθάσουν την ποσότητα των

100μl, 100μl σιπροφλοξασίνης (cip) συγκέντρωσης 3μg/ml και 100μl αμπικιλλίνης (ampi) συγκέντρωσης 10μg/ml αραιωμένα επίσης με ποσότητα dd H₂O. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που επιλέχθηκαν αντιστοιχούν στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στο πλάσμα του αίματος του ασθενή μετά τη χορήγηση του κάθε αντιβιοτικού, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 [73].

Πίνακας 3: Μέγιστες συγκεντρώσεις πλάσματος των αντιβιοτικών

ANTIBIOTIKO	ΜΕΓΙΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ (μg/ml)
<i>Αμπικιλλίνη</i>	<i>10μg/ml</i>
<i>Σιπροφλοξασίνη</i>	<i>3μg/ml</i>

➤ Agar diffusion method:

- ✓ 100μl εκχυλίσματος
- ✓ 53,5μl γαλακτώματος AgNPs + 46,5μl dd H₂O
- ✓ 36,2μl Cip + 63,8μl dd H₂O
- ✓ 10μl ampi + 90μl dd H₂O

Σε δεύτερο χρόνο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της πιθανής συνεργιστικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων με τα AgNPs αυτών, με την ανάμειξη των δύο σε μία κοιλότητα. Σε eppendorf προστέθηκαν 53,5μl από το γαλάκτωμα των AgNPs και φυγοκεντρήθηκαν σε φυγόκεντρο για την απομάκρυνση του DMSO που περιέχονταν στο γαλάκτωμα. Αφού έγινε απόρριψη του υπερκείμενου, στα AgNPs που επικάθισαν και διαχωρίστηκαν από

τον διαλύτη, προστέθηκαν τα 100 μl του αντίστοιχου εκχυλίσματος. Για την καλύτερη διαλυτοποίηση του μίγματος εφαρμόστηκαν υπέρηχοι για μερικά λεπτά. Τότε ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς μέθοδος, με τη διαφορά ότι αυτή τη φορά δε συμπεριλήφθηκε η ποσότητα της αμπικιλίνης, αφού τα αποτελέσματα αυτής ήταν ήδη γνωστά από την προηγούμενη διαδικασία για τον κάθε μικροοργανισμό.

➤ Agar diffusion method:

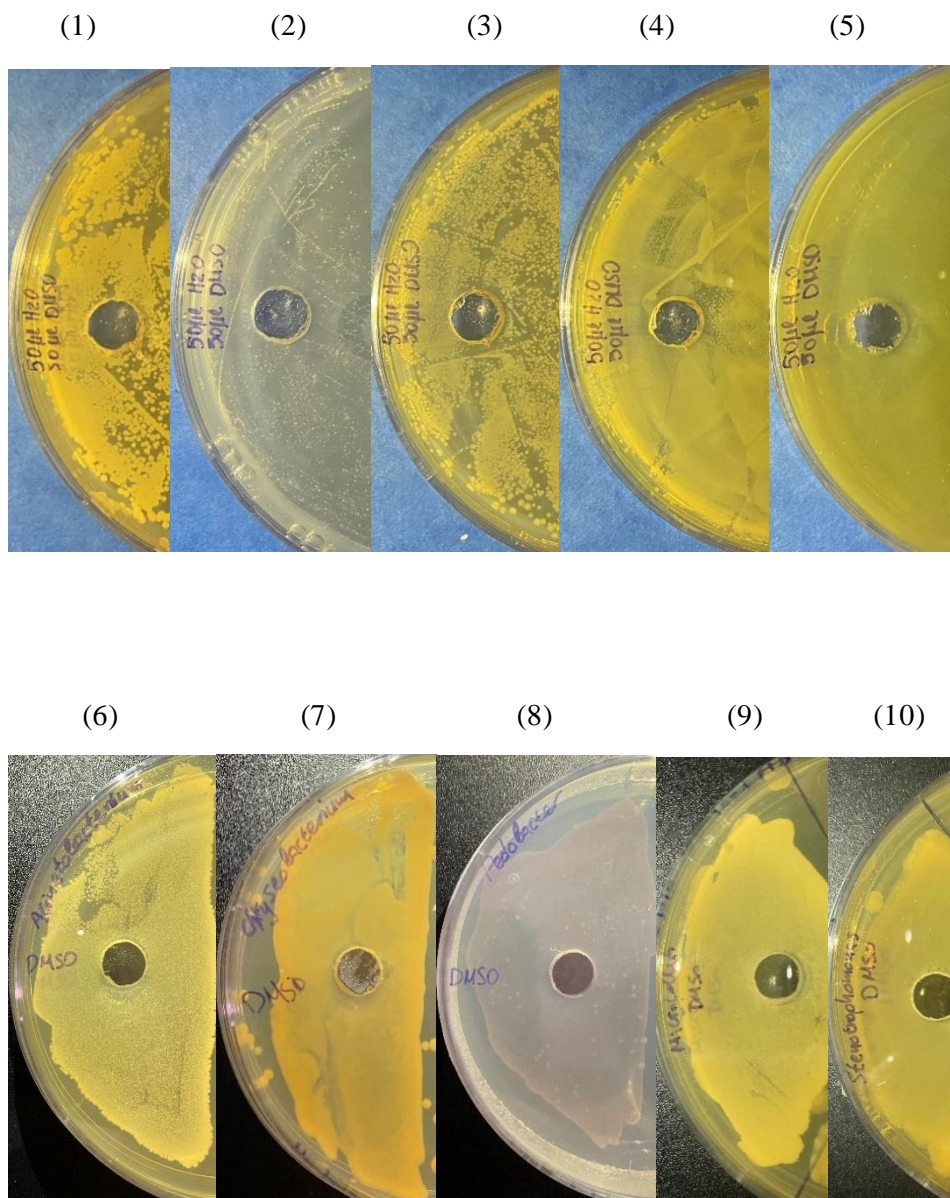
- 100μl μίγματος εκχυλίσματος και AgNPs
- 100μl εκχυλίσματος
- 53,5μl γαλακτώματος AgNPs + 46,5μl dd H₂O
- 36,2μl Cip + 63,8μl dd H₂O

Σε κάθε περίπτωση, τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 ή 37°C ανάλογα με τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού (Πίνακας 2) για 48 ώρες και έπειτα καταγράφηκαν οι ζώνες αναστολής που σχηματίστηκαν σε κάθε περίπτωση. Τέλος, αφού μετρήθηκε η ακτίνα του κυκλικού τομέα που σχηματίστηκε, λήφθηκαν φωτογραφίες από κάθε τρυβλίο μερικές εκ των οποίων επισυνάπτονται στα αποτελέσματα. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν.

3.2.4 Δοκιμή επίδρασης διαλύτη DMSO

Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο διάχυσης άγαρ πραγματοποιήθηκε ακόμη, δοκιμή της επίδρασης του διαλύτη διμεθυλοσουλφοξειδίου, DMSO, που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του γαλακτώματος των νανοσωματιδίων ούτως ώστε να αποκλειστεί το

ενδεχόμενο επιρροής στην πιθανή αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζουν τα AgNPs. Η ποσότητα του DMSO που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχεί στην ίδια ποσότητα των AgNPs που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 17: Επίδραση DMSO σε κάθε υπό εξέταση βακτηριακό στέλεχος. 1) S.aureus, 2) S.epidermidis, 3) E.coli, 4) Aeromonas veronii, 5) Pseudomonas aeruginosa, 6) Acinetobacter sp., 7) Cryseobacterium sp., 8) Pedobacter sp., 9) Micrococcus sp., 10) Stenotrophomonas sp.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *C.incanus*

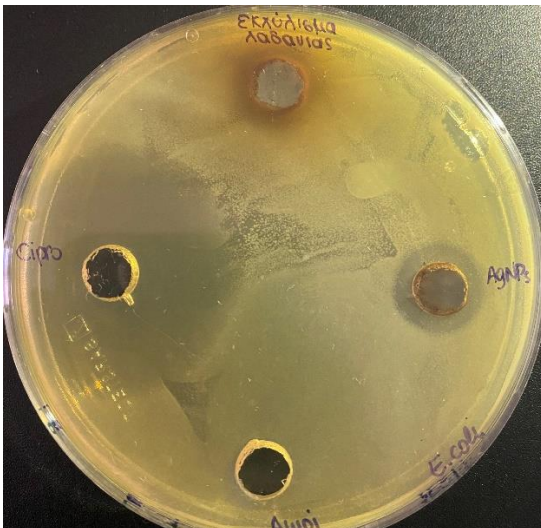
Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του *Cistus incanus* και των AgNPs αυτού, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3. Υλικά και Μέθοδοι, χρησιμοποιήθηκαν 100 μl από το κάθε δείγμα τα οποία αντιστοιχούν σε 8mg φυτού, τόσο στην περίπτωση του εκχυλίσματος όσο και στην περίπτωση των AgNPs. Η συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης που χρησιμοποιήθηκε, αντιστοιχεί στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στο πλάσμα του αίματος του ασθενή μετά τη χορήγηση αυτής. Μετά τις 48 ώρες επώασης, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για κάποια από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται ενδεικτικά στις Εικόνες 18-20, στις οποίες είναι εμφανής η αναστολή που προκαλούν το εκχύλισμα ή τα AgNPs.



Εικόνα 18: Επίδραση εκχυλίσματος *C.incanus* σε *Micrococcus sp.*



Εικόνα 19: Επίδραση εκχυλίσματος *C.incanus* σε *Chryseobacterium*



Εικόνα 20: Επίδραση AgNPs *C.incanus* σε *Escherichia coli*

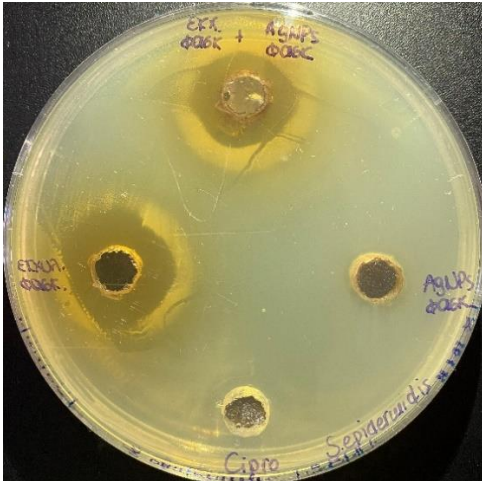
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν για όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 4. Οι τιμές που προκύπτουν κατά τη μέτρηση της ακτίνας του κυκλικού τομέα για κάθε ζώνη αναστολής που εμφανίζεται αναγράφονται σε χιλιοστά του μέτρου (mm) και προκύπτουν κάθε φορά από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων που συγκεντρώθηκαν μετά από κάθε επανάληψη. Έτσι, για τον *C. incanus* προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης *C. incanus*

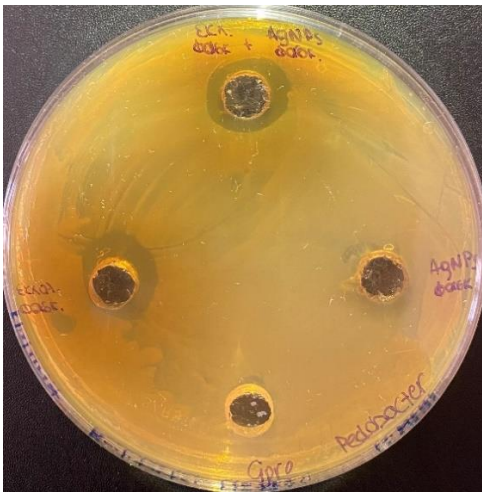
MO	Extract <i>C. incanus</i> (mm)	AgNPs (mm)	Extract <i>C. incanus</i> + AgNPs	Ampi (mm) 10µg/ml	Cipro (mm) 3µg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	2-3	2	2	6	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	1	-	-	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	1-2	-	2	2	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	-	4-5	2-3	-	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. <i>Pamvotica</i>	-	3	1-2	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	4	1	-	5
<i>Pedobacter sp.</i>	5-6	-	6	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	3	1	5	-	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	6	-	5-6	-	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	-	-	-	-

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *S. officinalis*

Με τον ίδιο τρόπο κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος της *Salvia officinalis* και των AgNPs αυτής, χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση 100 µl από το κάθε δείγμα τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε περίπτωση σε 8mg φυτού. Μετά τις 48 ώρες επώασης, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για κάποια από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται ενδεικτικά στις Εικόνες 21-23, στις οποίες είναι εμφανής η αναστολή που προκαλούν το εκχύλισμα ή τα AgNPs.



Εικόνα 21: Επίδραση εκχυλίσματος *S.officinalis* στον *Staphylococcus epidermidis*



Εικόνα 22: Επίδραση εκχυλίσματος *S.officinalis* στο *Pedobacter sp.*



Εικόνα 23: Επίδραση των AgNPs στην *Aeromonas veronii*

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν για όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Οι τιμές που προκύπτουν κατά τη μέτρηση

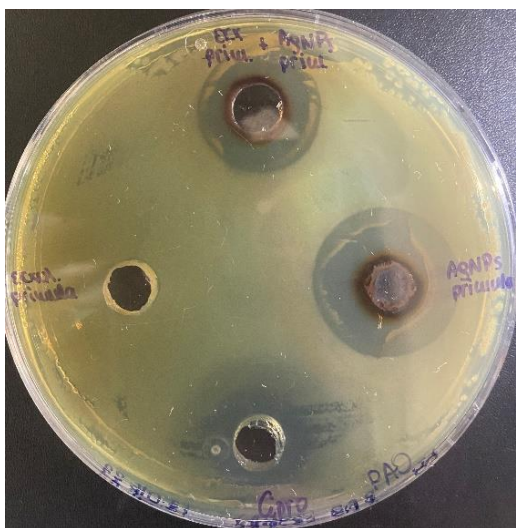
της ακτίνας του κυκλικού τομέα για κάθε ζώνη αναστολής που εμφανίζεται αναγράφονται σε mm και προκύπτουν κάθε φορά από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων που συγκεντρώθηκαν μετά από κάθε επανάληψη. Έτσι, για την *S. officinalis* προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης *S. officinalis*

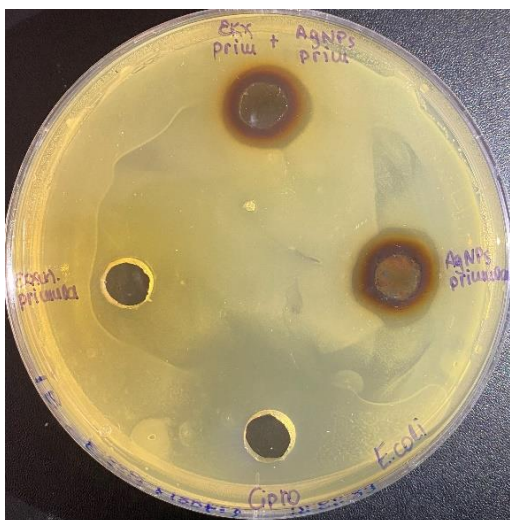
MO	Extract <i>S.officinalis</i> (mm)	AgNPs (mm)	Extract <i>S.officinalis</i> + AgNPs	Ampi (mm) 10μg/ml	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1-2	2-3	6	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7-8	1	6-7	-	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	3-4	-	3-4	2	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	-	3-4	4-5	-	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. Pamvotica	1	3	2-3	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	2-3	4-5	-	5
<i>Pedobacter sp.</i>	5-6	-	5	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	1	-	3	-	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	3	-	1-2	-	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	3-4	2-3	1-2	-	-

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *P. veris*

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος της *Primula veris* και των AgNPs αυτής, χρησιμοποιήθηκαν 100 μl από το κάθε δείγμα τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε περίπτωση σε 8mg φυτού. Μετά τις 48 ώρες επώασης, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για κάποια από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται ενδεικτικά στις Εικόνες 24-26, στις οποίες είναι εμφανής η έντονη αναστολή που προκαλούν τα AgNPs, αφού σε αυτή την περίπτωση το εκχύλισμα του φυτού δεν είχε καμία επίδραση έναντι των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών.



Εικόνα 24: Επίδραση των AgNPs στην *Pseudomonas aeruginosa*



Εικόνα 25: Επίδραση των AgNPs στην *Escherichia coli*



Εικόνα 26: Επίδραση των AgNPs στο *Chryseobacterium* sp.

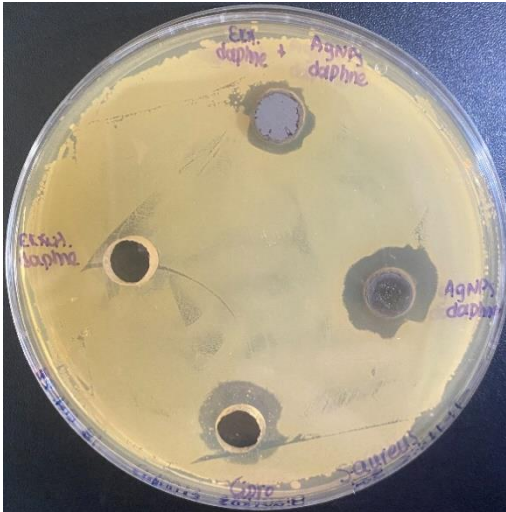
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν για όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 6. Οι τιμές που προκύπτουν κατά τη μέτρηση της ακτίνας του κυκλικού τομέα για κάθε ζώνη αναστολής που εμφανίζεται αναγράφονται σε mm και προκύπτουν κάθε φορά από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων που συγκεντρώθηκαν μετά από κάθε επανάληψη. Έτσι, για την *P. veris* προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 6: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης *P.veris*

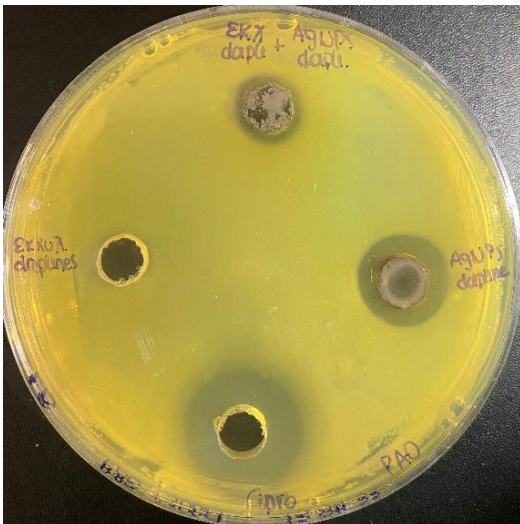
MO	Extract <i>P.veris</i> (mm)	AgNPs (mm)	Extract <i>P.veris</i> + AgNPs	Ampi (mm) 10μg/ml	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	3	3-4	6	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	5-6	4-5	-	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	-	4-5	3-4	2	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	-	5	3-4	-	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. Pamvotica	-	3	2	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8-9	5-6	-	5
<i>Pedobacter sp.</i>	-	2-3	-	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	-	6-7	5	-	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	8-10	7-8	-	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	2-3	1-2	-	-

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ *Daphnes oleoides*

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος της *D. oleoides* και των AgNPs αυτής, χρησιμοποιήθηκαν 100 μl από το κάθε δείγμα τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε περίπτωση σε 8mg φυτού. Μετά τις 48 ώρες επώασης, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για κάποια από τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται ενδεικτικά στις Εικόνες 27-28, στις οποίες είναι εμφανής η έντονη αναστολή που σχηματίζουν τα AgNPs, αφού και σε αυτή την περίπτωση το εκχύλισμα του φυτού δεν είχε καμία επίδραση έναντι των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών.



Εικόνα 27: Επίδραση των AgNPs στον *S. aureus*



Εικόνα 28: Επίδραση των AgNPs στην *Pseudomonas aeruginosa*

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 7. Οι τιμές που προκύπτουν κατά τη μέτρηση της ακτίνας του κυκλικού τομέα για κάθε ζώνη αναστολής που εμφανίζεται αναγράφονται σε mm και προκύπτουν κάθε φορά από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων που συγκεντρώθηκαν μετά από κάθε επανάληψη. Έτσι, για την *D. oleoides* προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης *D.oleoides*

MO	Extract <i>D. oleoides</i> (mm)	AgNPs (mm)	Extract <i>D. oleoides</i> + AgNPs	Ampi (mm) 10μg/ml	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	4	2	6	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	4	3	-	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	-	4-5	2-3	2	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	-	3	1	-	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. <i>Pamvotica</i>	-	3	1-2	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	4-5	2	-	5
<i>Pedobacter sp.</i>	-	1-2	-	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	-	4	3	-	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	6-7	3-4	-	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	3	-	-	-

4.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων και των τεσσάρων φυτών, προκειμένου να γίνει η σύγκριση μεταξύ των επιλεγμένων φυτών, προκύπτει ο Πίνακας 8.

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας αντιμικροβιακής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων των τεσσάρων φυτών.

MO	Extract <i>C.incanus</i> (mm)	Extract <i>S.officinalis</i> (mm)	Extract <i>P.veris</i> (mm)	Extract <i>D.oleoides</i> (mm)	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	2-3	3	-	-	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	7-8	-	-	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	1-2	3-4	-	-	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. Pamvotica	-	1	-	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	5
<i>Pedobacter sp.</i>	5-6	5-6	-	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	3	1	-	-	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	6	3	-	-	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	3-4	-	-	-

4.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ AgNPs ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs τα οποία παρασκευάστηκαν με βάση τα εκχυλίσματα των φυτών αντίστοιχα, ούτως ώστε να συγκριθούν οι διάφορες δράσεις για τα τέσσερα επιλεγμένα φυτά, προκύπτει ο Πίνακας 9. Όλα τα AgNPs που παρασκευάστηκαν από κάθε φυτό αντιστοιχούν στην ίδια ποσότητα φυτού, δηλαδή σε 8mg.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs των εκχυλισμάτων των τεσσάρων φυτών.

ΜΟ	AgNPs <i>C.incanus</i> (mm)	AgNPs <i>S.officinalis</i> (mm)	AgNPs <i>P.veris</i> (mm)	AgNPs <i>D.oleoides</i> (mm)	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1-2	3	4	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1	5-6	4	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	-	-	4-5	4-5	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	4-5	3-4	5	3	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. Pamvotica	3	3	3	3	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2-3	8-9	4-5	5
<i>Pedobacter sp.</i>	-	-	2-3	1-2	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	1	-	6-7	4	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-	8-10	6-7	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	2-3	2-3	3	-

4.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

ΜΕ ΤΑ AgNPs

Σε κάθε περίπτωση, τα AgNPs που χρησιμοποιούνται παρασκευάστηκαν από το υδατικό εκχύλισμα του κάθε φυτού αντίστοιχα, παρουσία του διαλύτη DMSO, συνθέτοντας ένα τελικό γαλάκτωμα AgNPs συγκέντρωσης 2mg/ml το οποίο περιέχει και τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Ο συνδυασμός των υδατικών εκχυλισμάτων με τα AgNPs απουσία του διαλύτη διερευνήθηκε με στόχο να διερευνηθεί η πιθανή συνεργιστική

δράση μεταξύ των υδατικών εκχυλισμάτων και των AgNPs αυτών. Στον Πίνακα 10

συνοψίζονται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη δοκιμή αυτή.

Πίνακας 10: Συγκεντρωτικός πίνακας αντιμικροβιακής δράσης του μίγματος των εκχυλισμάτων με τα των AgNPs τεσσάρων φυτών.

MO	Extract <i>C. incanus</i> + AgNPs	Extract <i>S. officinalis</i> + AgNPs	Extract <i>P. veris</i> + AgNPs	Extract <i>D. oleoides</i> + AgNPs	Cipro (mm) 3μg/ml
Gram (+)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2-3	3-4	2	3-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	6-7	4-5	3	5-6
<i>Micrococcus sp.</i>	2	3-4	3-4	2-3	4
Gram (-)					
<i>Escherichia coli</i>	2-3	4-5	3-4	1	12-13
<i>Aeromonas veronii</i> var. <i>Pamvotica</i>	1-2	2-3	2	1-2	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4-5	5-6	2	5
<i>Pedobacter sp.</i>	6	5	-	-	-
<i>Chryseobacterium sp.</i>	5	3	5	3	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	5-6	1-2	7-8	3-4	3-4
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	-	1-2	1-2	-	-

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά μικροοργανισμοί υπάρχουν παντού στο περιβάλλον και μπορούν να κινούνται μεταξύ διαφορετικών οικοσυστημάτων και να διευκολύνουν την εξάπλωση των γονιδίων αντοχής που διαθέτουν με αποτέλεσμα να μπορούν να προσδώσουν αντίσταση σε άλλους οργανισμούς. Η μικροβιακή αντοχή είναι ένα σύνθετο πρόβλημα δημόσιας υγείας που αφορά τους τομείς του ανθρώπου, των ζώων, της γεωργίας και του περιβάλλοντος και δεν αναγνωρίζει σύνορα ανθρώπου-ζώου ή γεωγραφικά σύνορα. Επομένως, καμία στρατηγική ή παρέμβαση δεν είναι επαρκής για την πλήρη αντιμετώπιση της εμφάνισης και της εξάπλωσης μολυσματικών οργανισμών που γίνονται ανθεκτικοί στα διαθέσιμα αντιμικροβιακά φάρμακα [7].

Η ανάγκη για τη διερεύνηση νέων αντιβιοτικών φαρμάκων είναι εξαιρετικά μεγάλη, ενώ ακόμη η δυσπιστία των αντιμικροβιακών παραγόντων συνθετικής προέλευσης λόγω της πιθανής τοξικότητας και καρκινογένεσης έχει εντείνει τις προσπάθειες για την ανακάλυψη φυσικών εναλλακτικών λύσεων. Ο κλάδος της επιστήμης έχει πλέον στρέψει το ενδιαφέρον του στη μελέτη των φυτικών φαρμάκων ως πιθανούς αντιμικροβιακούς παράγοντες οι οποίοι ενδεχομένως θα αντικαταστήσουν κάποια στιγμή στο μέλλον τα διαθέσιμα αντιβιοτικά φάρμακα [74].

5.1 *Cistus incanus*

Ο *C. incanus* είναι ένα φυτό το οποίο έχει αποδείξει εν καιρώ εξαιρετική φαρμακευτική δράση καθώς και σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών υπεύθυνων για διάφορες βακτηριακές λοιμώξεις.

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τον *C. incanus*, τόσο τα αιθέρια έλαια όσο και τα διάφορα εκχυλίσματα που παρασκευάζονται από τα μέρη του φυτού έχουν εμφανίσει έντονη αντιβακτηριακή δραστικότητα η οποία έχει αποδειχθεί ότι αποδίδεται στην παρουσία των διτερπενικών και πολυφαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται στο φυτό αυτό. Τα διτερπένια που εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο αιθέριο έλαιο, φαίνεται πως είναι υπεύθυνα για την αντιμικροβιακή δράση του ελαίου, ενώ στην περίπτωση των εκχυλισμάτων (υδατικών, μεθανολικών, αιθανολικών), οι βιοδραστικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση φαίνεται να είναι οι φαινολικές. Η φλαβονόλη, η κερκετίνη και η καμπφερόλη είναι παραδείγματα πολυφαινολών με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση. Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία κατηγορία οργανικών χημικών ενώσεων οι οποίες εντοπίζονται στα περισσότερα φυτά και τα προστατεύουν από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, ενώ ακόμη έχει αποδειχθεί πως είναι υπεύθυνες για τις φαρμακευτικές τους δράσεις. Το γένος *Cistus*, στο οποίο ανήκει ο *C. incanus* ανήκει στην κατηγορία φυτών με το υψηλότερο επίπεδο πολυφαινολών στην Ευρώπη γεγονός που μπορεί να υποδείξει την ισχυρή αντιμικροβιακή δραστικότητά του [26-29].

Σε προηγούμενες μελέτες, έχει αναφερθεί πως τόσο τα υδατικά όσο και τα αλκοολικά εκχυλίσματα εμφανίζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια [30, 33]. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, αποδεικνύεται πως στην κατηγορία των Gram αρνητικών βακτηριακών στελεχών το υδατικό εκχύλισμα του *C. incanus* σε άλλες περιπτώσεις δείχνει ισχυρή ανασταλτική δράση, ενώ σε άλλες δεν εμφανίζει καμία δραστικότητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις του *Pedobacter sp.* και του *Acinetobacter sp.*, δύο εξαιρετικά ανθεκτικών βακτηρίων υπεύθυνων για διάφορες νοσοκομειακές λοιμώξεις,

κατά τις οποίες παρατηρείται πολύ ισχυρή δραστηριότητα του εκχυλίσματος και μάλιστα ακόμη μεγαλύτερη και από αυτή της σιπροφλοξασίνης.

Στην περίπτωση των AgNPs του *C. incanus* παρατηρείται μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος και των AgNPs καθώς φαίνεται πως στα βακτηριακά στελέχη στα οποία είναι δραστικό το εκχύλισμα, δεν προκαλούν κάποια αναστολή τα AgNPs, ενώ αντίστροφα, τα βακτηριακά στελέχη των οποίων αναστέλλεται η ανάπτυξη από τα AgNPs, το εκχύλισμα δεν εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα. Η αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζουν τα AgNPs αποδίδεται αποκλειστικά σε αυτά, καθώς έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο να δρουν ανασταλτικά είτε υπολείμματα ιόντων αργύρου, αφού έχουν απομακρυνθεί, είτε ο χρησιμοποιούμενος κατά την παρασκευή του γαλακτώματος των AgNPs διαλύτης, DMSO. Η δραστηριότητα οφείλεται στις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο εκχύλισμα οι οποίες δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες για την αναγωγή του αργύρου καθώς και ως σταθεροποιητές των NPs κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων.

Συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής που καταγράφηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος και των AgNPs του *C. incanus* με τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση πλάσματος, έχει παρόμοια δράση με το εκχύλισμα στα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Chryseobacterium sp.* και με τα AgNPs στην *Pseudomonas aeruginosa*, στην ελάχιστη ποσότητα που έχει χρησιμοποιηθεί για το εκχύλισμα και τα AgNPs κάθε φορά, αυτή των 8mg. Ουσιαστικά, μία πολύ μικρή ποσότητα φυτού, 8mg, δείχνει παρόμοια δραστηριότητα με αυτή που έχει δείξει και προκαλεί η σιπροφλοξασίνη στη συγκέντρωση που αναφέρεται. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρουσιάζει η περίπτωση του

Acinetobacter sp. στην οποία διαπιστώθηκε πολύ μεγαλύτερη δράση του εκχυλίσματος από αυτή της σιπροφλοξασίνης καθώς και η περίπτωση του *Pedobacter sp.* στην οποία η σιπροφλοξασίνη δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηριακού αυτού στελέχους, ενώ το εκχύλισμα φαίνεται πως αναστέλλει την ανάπτυξή του. Δεν γίνεται λόγος για το αντιβιοτικό της αμπικιλίνης καθώς τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε αυτήν.

5.2 *Salvia officinalis*

Η *S. officinalis*, γνωστή και ως φασκόμηλο, αποτελεί ένα από τα πιο πολύτιμα βότανα της φύσης το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στην αρχαιότητα και χρησιμοποιείται ακόμη για το ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων που διαθέτει.

Σύμφωνα με έρευνες, η πληθώρα των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων, κατηγορίες των πολυφαινολών, που εντοπίζονται στην *S. officinalis* είναι και αυτές που είναι υπεύθυνες για την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του φυτού αυτού. Τόσο το αιθέριο έλαιο, όσο και τα διάφορα εκχυλίσματα που προκύπτουν κατά την έγχυση του φασκόμηλου, έχουν παρουσιάσει ισχυρή δραστηριότητα, η οποία αποδίδεται στις φαινολικές ενώσεις [34].

Και σε αυτή την περίπτωση του φυτού παρατηρείται μία αντίστροφη σχέση αναστολής μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος και των AgNPs. Βακτήρια ανθεκτικά στο εκχύλισμα παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στα AgNPs ενώ αντίστροφα τα βακτήρια εκείνα που δεν επηρεάζονται από τα AgNPs φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα που καταγράφονται ωστόσο για το εκχύλισμα του φασκόμηλου φαίνεται να είναι αρκετά σημαντικά και ιδιαίτερα για τα θετικά κατά Gram βακτήρια.

Συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής που καταγράφηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του υδατικού εκχυλίσματος και των AgNPs της *S. officinalis* με τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση πλάσματος, έχει παρόμοια δράση με το εκχύλισμα στα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.* *Chryseobacterium sp.* και *Acinetobacter sp.*, στην ελάχιστη ποσότητα που έχει χρησιμοποιηθεί, αυτή των 8mg. Επιπλέον, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του *Pedobacter sp.* στην οποία διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηριακού αυτού στελέχους, ενώ το εκχύλισμα φαίνεται πως αναστέλλει την ανάπτυξη του, ενώ ακόμη στην περίπτωση της *Stenotrophomonas sp.*, φαίνεται πως η ίδια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο εκχύλισμα και στα AgNPs σε αντίθεση με την σιπροφλοξασίνη στην οποία παρουσιάζει ανθεκτικότητα.

5.3 *Primula veris*

Η *P. veris* ανήκει και αυτή στην κατηγορία των φαρμακευτικών φυτών χάρη στην πληθώρα των φλαβονοειδών, των φαινολικών γλυκοζιτών και άλλων βιοδραστικών ενώσεων που εντοπίζονται στα άνθη και τις ρίζες της [47].

Κύρια δράση του φυτού αυτού είναι η καταπραϋντική καθώς δρα άμεσα στο νευρικό σύστημα και βοηθά στην καταπολέμηση του άγχους και του στρες, ενώ συμβάλλει και στη θεραπεία του βήχα, της βρογχίτιδας, της πνευμονίας, του πονοκεφάλου και άλλων. Ωστόσο, δεν υπάρχει μέχρι τώρα κάποια προηγούμενη μελέτη που να αναφέρεται στην αντιμικροβιακή δράση της *P. veris* [46, 49].

Στην παρούσα μελέτη, το υδατικό εκχύλισμα της πρίμουλα δεν κατέδειξε καμία δραστικότητα έναντι των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών. Αντίθετα το γαλάκτωμα των AgNPs παρουσίασε ιδιαίτερα σημαντική δραστικότητα και μάλιστα στις περιπτώσεις των *Pseudomonas aeruginosa*, *Chryseobacterium sp.* και *Acinetobacter sp.* το αποτέλεσμα ήταν μεγαλύτερο και από αυτό που κατέδειξε η σιπροφλοξασίνη.

Συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής που καταγράφηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs της *P. veris* με τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση πλάσματος, έχει παρόμοια δράση με τα AgNPs στα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Micrococcus sp.*, στην ελάχιστη ποσότητα που χρησιμοποιείται, των 8mg. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει η περίπτωση του *Pedobacter sp.* και της *Stenotrophomonas sp.* στις οποίες διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών αυτών στελεχών τα οποία χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα παθογόνα και ανθεκτικά στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά, ενώ τα AgNPs φαίνεται πως αναστέλλουν την ανάπτυξή τους.

5.4 *Daphnes oleoides*

Αν και τα είδη της *Daphne* έχουν αναγνωρισθεί από καιρό για τις τοξικές τους επιδράσεις, η *D. oleoides* χρησιμοποιείται ήδη στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία διάφορων παθήσεων εδώ και πολλά χρόνια χάριν στην πληθώρα βιοδραστικών χημικών ουσιών που διαθέτει. Μεταξύ αυτών, εντοπίζονται διάφορα φλαβονοειδή όπως καμπφερόλη και κερκετίνη, διάφορα τερπενοειδή, κουμαρίνες και λιγνάνες, κατηγορίες ενώσεων με αποδεδειγμένη αντιβακτηριακή δράση [53, 54].

Διάφορες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αντιβακτηριακή δράση της *D. oleoides* λόγω της παρουσίας των βιοδραστικών αυτών ενώσεων που διαθέτει. Τόσο το αιθέριο έλαιο που παρασκευάζεται από το φυτό αυτό, όσο και τα διάφορα αλκοολικά εκχύλισματα, έχουν επιδείξει έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι διαφόρων βακτηριακών στελεχών θετικών και αρνητικών κατά Gram. Ωστόσο, σε μία έρευνα διαπιστώθηκε πως το υδατικό εκχύλισμα της *D. oleoides* δεν παρουσίασε καμία αντιβακτηριακή δραστηριότητα [56].

Στην παρούσα μελέτη, το υδατικό εκχύλισμα της *D. oleoides* δεν κατέδειξε καμία δραστηριότητα έναντι των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, επιβεβαιώνοντας έτσι τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αντίθετα το γαλάκτωμα των AgNPs παρουσίασε ιδιαίτερα σημαντική δραστηριότητα και μάλιστα στις περιπτώσεις των *Chryseobacterium sp.* και *Acinetobacter sp.* το αποτέλεσμα ήταν μεγαλύτερο και από αυτό που κατέδειξε η σιπροφλοξασίνη.

Συγκρίνοντας τις ζώνες αναστολής που καταγράφηκαν κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των AgNPs της *D. oleoides* με τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη στη μέγιστη θεραπευτική συγκέντρωση πλάσματος, έχει παρόμοια δράση με τα AgNPs στα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.* και *Pseudomonas aeruginosa* στην ελάχιστη ποσότητα που χρησιμοποιείται, των 8mg. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον, παρουσιάζει η περίπτωση του *Pedobacter sp.* και της *Stenotrophomonas sp.* και σε αυτή την περίπτωση στις οποίες διαπιστώθηκε πως η σιπροφλοξασίνη δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηριακών αυτών στελεχών τα οποία χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα παθογόνα και ανθεκτικά στα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά, ενώ τα AgNPs φαίνεται πως αναστέλλουν την ανάπτυξή τους.

5.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Στην περίπτωση αυτή, η σύγκριση αφορά μόνο τα φυτά *C. incanus* και *S. officinalis* σε σχέση με τη δράση της σιπροφλοξασίνης έναντι των βακτηρίων, αφού τα υδατικά εκχυλίσματα των άλλων δύο φυτών δεν είχαν καμία αντιμικροβιακή δράση. Τα δύο εκχυλίσματα φαίνεται να έχουν παρόμοια δράση αφού τα διάφορα βακτήρια εμφανίζουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα σε κάθε φυτό κατά αντίστοιχο τρόπο. Συγκρίνοντας τα υδατικά εκχυλίσματα των δύο φυτών θα μπορούσε να διεξαχθεί το συμπέρασμα πως η *S. officinalis* ή φασκόμηλο, είναι αυτή που έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηριακών στελεχών τα οποία επιλέχθηκαν για τη μελέτη.

5.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ AgNPs ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Από τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον Πίνακα 9 φαίνεται πως τα AgNPs των *P. veris* και *D. oleoides* παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ξανά πως η αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζουν τα AgNPs αποδίδεται αποκλειστικά σε αυτά, καθώς έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο να δρουν ανασταλτικά είτε υπολείμματα ιόντων αργύρου που πιθανό να είχαν επικαθίσει, αφού έχουν απομακρυνθεί πλήρως, είτε ο χρησιμοποιούμενος κατά την παρασκευή του γαλακτώματος των AgNPs διαλύτης, DMSO. Η δραστηριότητα των AgNPs που βιοσυντίθενται με βάση κάποιο φυτικό εκχύλισμα έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο φυτό αυτό, οι οποίες δρουν ως αναγωγικοί

παράγοντες για την αναγωγή των ιόντων αργύρου καθώς και ως σταθεροποιητές των NPs κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων [75].

Το γεγονός ότι το εκχύλισμα με τα AgNPs παρουσιάζουν διαφορετική κάθε φορά δράση σε κάθε φυτό και όχι την ίδια όπως θα αναμενόταν καθώς η παρουσία των βιοδραστικών ενώσεων των φυτών είναι αυτή που είναι υπεύθυνη για την αντιμικροβιακή δράση σε κάθε περίπτωση, θα μπορούσε να αποδοθεί στον τρόπο διάχυσης των δειγμάτων. Αυτό που διακρίνει τα NPs και τα εντάσσει σε πολλούς κλάδους των επιστημών είναι το μέγεθός τους αλλά και η εφαρμογή τους στα διάφορα πεδία. Με διαφορετικό τρόπο διαχέονται τα AgNPs των φυτικών εκχυλισμάτων μέσα στο τρυβλίο στο οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός και με διαφορετικό τρόπο διαχέεται το υδατικό εκχύλισμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αναμένεται κάθε φορά να αναστέλλεται με διαφορετικό τρόπο η ανάπτυξη των μικροοργανισμών από τα υδατικά εκχυλίσματα και τα AgNPs των εκχυλισμάτων. Έτσι, μία υπόθεση θα μπορούσε να είναι πως η μειωμένη δράση που παρατηρείται στα AgNPs των εκχυλισμάτων να οφείλεται στον τρόπο διάχυσής τους μέσα στο τρυβλίο και ενώ οι βιοδραστικές ενώσεις που εντοπίζονται στα φυτά είναι αυτές που είναι υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση τόσο στο εκχύλισμα όσο και στα AgNPs αυτού, τα δύο αυτά δείγματα για το λόγο αυτό να εμφανίζουν και διαφορετικές δράσεις. Ωστόσο βάση του Πίνακα 9, θα μπορούσε να απορριφθεί το ενδεχόμενο αυτό, αφού σε πολλές περιπτώσεις όπως για παράδειγμα στην *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter sp.* η δράση των AgNPs της *P. veris* και της *D. oleoides* είναι καλύτερη από αυτή των εκχυλισμάτων, καθώς σχηματίζουν ζώνη αναστολής 8mm και 5-7mm αντίστοιχα. Ακόμη, οι περιπτώσεις στις οποίες δεν παρατηρείται αντιμικροβιακή δράση των υδατικών εκχυλισμάτων ενώ τα AgNPs φαίνεται να δρουν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, θα μπορούσαν να αποδοθούν στο ότι πιθανόν οι δραστικές

ουσίες εκτίθενται πολύ καλύτερα στην κατηγορία αυτών των AgNPs. Η διαφορετική δράση των AgNPs με το εκχύλισμα θα μπορούσε να αποδοθεί επίσης και στο ότι στην περίπτωση των AgNPs πολλές δραστικές ενώσεις «εγκλωβίζονται» στο πλέγμα των νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δράσουν. Συγκρίνοντας τα AgNPs των επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων θα μπορούσε να διεξαχθεί το συμπέρασμα πως η *P. veris* είναι αυτή που φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηριακών στελεχών στα οποία έγινε η μελέτη.

5.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΑ AgNPs

Συγκρίνοντας τον Πίνακα 10, με τους Πίνακες 8 και 9 διαπιστώθηκε πως σε κανένα από τα τέσσερα υπό μελέτη φαρμακευτικά φυτά δεν παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση του εκχυλίσματος με τα AgNPs. Η αναστολή που παρατηρήθηκε κάθε φορά οφείλεται στο εκχύλισμα ή στα AgNPs ξεχωριστά, αφού τα αποτελέσματα κάθε δοκιμής είναι παρόμοια με τη δράση που προκαλεί το κάθε ένα μεμονωμένα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που παρατηρούνται στον Πίνακα 10 για τον κάθε μικροοργανισμό σε κάθε φυτό, είναι όμοια με εκείνα που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα ή τα AgNPs αντίστοιχα (Πίνακας 8 και 9), με εκείνο στο οποίο εμφανιζόταν μεγαλύτερη ζώνη αναστολής και αυτό αποκλείει το ενδεχόμενο για πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο. Διαφορετικά, θα αναμενόταν να εμφανιστεί μία ζώνη αναστολής πολύ μεγαλύτερη από αυτή που σχηματίζουν τα εκχυλίσματα ή τα AgNPs.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το υδατικό εκχύλισμα της *S. officinalis* μπορεί να θεωρηθεί πως περιέχει έναν ή περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να απομονωθούν και να μελετηθούν. Ακόμη, το υδατικό εκχύλισμα του *C. incanus*, δείχνει αξιοσημείωτη δραστικότητα και ιδιαίτερα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ τα εκχυλίσματα των *P. veris* και *D. oleoides* δε φαίνεται να έχουν κάποια αντιμικροβιακή δραστικότητα, τουλάχιστον στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Όσον αφορά την περίπτωση των νανοσωματιδίων, τα AgNPs της *P. veris* εμφανίζουν συγκρίσιμη αντιμικροβιακή δράση και σε πολλές περιπτώσεις πιο ισχυρή και από τη δράση της σιπροφλοξασίνης. Τα AgNPs της *D. oleoides* φαίνεται επίσης να έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση η οποία υπολείπεται όμως των προαναφερθέντων. Τέλος, τα AgNPs των *S. officinalis* και *D. oleoides* δείχνουν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση και ιδιαίτερα έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/08/Ti-prepei-na-gnorizete-gia-tin-mikroviaki-antoxi.pdf>
- [2]. <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM207/%CE%94%CE%B7%CC%81%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1%20%CE%A0%CE%B1%CF%85%CC%81%CE%BB%CE%BF%CF%85%20-%CE%A0%CE%B5%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%B9%CE%BB%CE%B9%CC%81%CE%BD%CE%B7.pdf>
- [3]. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.
- [4]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts>
- [5]. <https://eody.gov.gr/mikroviaki-antochi-kai-loimoxeis-poy-syndeontai-me-choroys-parochis-ygeias/>
- [6]. <https://medanalysis.gr/mikroviaki-antochi-antiviotika/>
- [7]. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Geneva: World Health Organization; 2018.
- [8]. Waller, D. G., & Sampson, A. P., Chemotherapy of infections. Medical Pharmacology and Therapeutics; 2018. 581–629. DOI:10.1016/b978-0-7020-7167-6.00051-8
- [9]. <https://eclass.upatras.gr > file.php > MED1189>
- [10]. S. Saleh, A. Staes, S. Deborggraeve, K. Gevaert, Targeted Proteomics for Studying Pathogenic Bacteria, Proteomics and Systems Biology; 2019. DOI: 10.1002/pmic.201800435

- [11]. Zhijuan Hu, W. Zhang, Signaling Natural Products from Human Pathogenic Bacteria, Infectious Diseases, ACS: American Chemical Society; 2019. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00286
- [12].http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2724/Biologia_G-Lykeiou_html-apli/index1_2.html
- [13]. <https://www.nhs.uk/conditions/antibiotics/>
- [14]. <https://www.drugs.com/article/antibiotics.html>
- [15]. K. Bush, P. A. Bradford, b-Lactams and b-Lactamase Inhibitors: An Overview, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine; 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247
- [16]. G. S. Bbosa, N. Mwebaza, J. Odda, D. B. Kyegombe, M. Ntale, Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, Health; 2014. 410-425 <http://dx.doi.org/10.4236/health.2014.65059>
- [17]. G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan, Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians, Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology; 2017. DOI: 10.4103/joacp.JOACP_349_15
- [18].<https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/dossier/phytopharmaceuticals-fighting-disease-with-natural-substances>
- [19] <https://www.cretafarms.gr/article/aladania-to-yperoplo-tis-fysis-sto-piatio-mas-2/>
- [20].<https://www.proionta-tis-fisis.com/lavdano-ladania-kistos-prostatevei-tin-kardia-apotojinonei-ehei-antimykitiaki-kai-antiiki-drasi/>
- [21]. <https://botanologio.com/cistus-how-to-collect/>

- [22]. I. Fecka, M. Włodarczyk, A. Starzec, Isolation and structure elucidation of cistusins: A new ellagitannin from *Cistus × incanus* L. Leaves, *Industrial Crops & Products*; 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112971>
- [23]. K. Kuchtaa, N. Huu Tungc, T. Ohtac, T. Utoc, M. Raekiansyahd, K. Grötzingere, H. Rauschf, Y. Shoyamac, H. Wilhelm Rauwalde, K. Moritad, The old pharmaceutical oleoresin labdanum of *Cistus creticus* L. exerts pronounced in vitro anti-dengue virus activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 2019.
- [24]. M. Rosa Loizzo , M. B. Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini , R. Tundis, Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology*; 2013.
- [25]. <https://www.togiatrosofi.gr/ladania-kistos>
- [26]. H. W.Rauwalda, T. Liebolda, K. Grötzingera, J. Lehmannb, K. Kuchtaa, Labdanum and Labdanes of *Cistus creticus* and *C. ladanifer*: Anti-Borrelia activity and its phytochemical profiling. *Phytomedicine*; 2019.
- [27]. M. Skoric, S. Todorovic, N. Gligorijevic, R. Jankovic, S. Zivkovi, M. Ristic, S. Radulovic, Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines, *Industrial Crops and Products*; 2012. 153-159. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.01.017
- [28]. <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/15352-polyfainoles>
- [29]. F. Javier Álvarez-Martínez, J. Carlos Rodríguez, F. Borrás-Rocher, E. Barrajón-Catalán, V. Micol, The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic

composition, Scientific Reports; 2021. 11:588. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80003>.

[30]. Á. M. Móricz, D. Szeremeta, M. Knas, E. Długoszc, P. G. Ott, T. Kowalska, M. Sajewicz, Antibacterial potential of the *Cistus incanus* L. phenolics as studied with use of thin-layer chromatography combined with direct bioautography and in situ hydrolysis, Journal of Chromatography; 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.056>

[31]. C. Hannig, B. Spitzmuller, A. Al-Ahmad, M. Hannig, Effects of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle, Journal of Dentistry; 2008. 540–545, DOI:10.1016/j.jdent.2008.04.002

[32]. S Ait Lahcena, L El Hattabi, R. Benkaddour, N. Chahbounc, M. Ghanmi, B. Satrani, M. Tabyaoui, A. Zarrouka, Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus Creticus* leaves, Chemical Data Collections; 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100346>

[33]. A. Viapianaa, A. Konopackab, K. Waleronb, M. Wesolowski, *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet, Industrial Crops & Products; 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.066>

[34]. A. Ghorbani, M. Esmailizadeh, Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, Journal of Traditional and Complementary Medicine; 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>

[35]. <https://www.ofarmakopiosmou.gr/blog/faskomilo-ena-votano-me-simantikes-idiotites>

[36]. D. Altindal, N. Altindal, Sage (*Salvia officinalis*) Oils, Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety; 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00081-X>

- [37]. http://mediplantepirus.med.uoi.gr/pharmacology/plant_details.php?id=148
- [38]. S. K. El Euch, D.B. Hassine, S. Cazaux, N. Bouzouita, J. Bouajila, *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of antienzymatic and antioxidant bioactivities, *South African Journal of Botany*; 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.010>
- [39]. Zuo-Fu Weia , Ren-Na Zhaoa , Li-Jia Dongb , Xiang-Yu Zhaoa , Jun-Xia Sua , M. Zhaoa , L. Lia , Yan-Jie Biana , Lin-Jing Zhang, Dual-cooled solvent-free microwave extraction of *Salvia officinalis* L. essential oil and evaluation of its antimicrobial activity, *Industrial Crops & Products*; 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.058>
- [40]. I. Maliki, I. Es-safib, A. El Moussaoui, H. Mechchate, Y. Oulad El Majdoubc, A. Bouymajanea, F. Cacciola, L. Mondelloc, K. Elbadaoui, *Salvia officinalis* and *Lippia triphylla*: Chemical characterization and evaluation of antidepressant-like activity, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114207>
- [41]. 11. Y. Lekbach, Z. Li, D. Xu, S. El Abed, Y. Dong, D. Liu, T. Gu, S. I. Koraichi, K. Yang, F. Wang, *Salvia officinalis* extract mitigates the microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Bioelectrochemistry*; 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.006>
- [42]. F. S. Ferreira Mendes, L. M. Garcia, T. da Silva Moraes, L.A. Casemiro, C. Barbosa de Alcantara, S. R. Ambrosio, R. C. Sola Veneziani, M. L. Dantas Miranda, C. H. Gomes Martins, Antibacterial activity of *salvia officinalis* L. against periodontopathogens: An in vitro study, *Anaerobe*; 2020. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102194>
- [43]. <https://enallaktikidrasi.com/2017/03/primula-therpaeutikes-idiotites-tropoi-xrisis/>

- [44]. A. Majid, S. Hassan, W. Hussain, Afzal Khan, A. Hassan, Ajmal Khan, T. Khan, T. Ahmad, M. Ur Rehman, In vitro Approaches of *Primula vulgaris* Leaves and Roots Extraction against Human Pathogenic Bacterial Strains, *World Applied Sciences Journal*; 2014. 575-580, DOI: 10.5829/idosi.wasj.2014.30.05.82264
- [45]. <https://www.jardineriaon.com/el/primula-veris.html>
- [46]. http://mediplantepirus.med.uoi.gr/pharmacology/plant_details.php?id=386
- [47]. K. Bdczek, JarosBaw L. PrzybyB, M. Mirgos, O. Kosakowska, I. Szymborska-Sandhu, Z. Wwglarz, Phenolics in *Primula veris* L. and *P. elatior* (L.) Hill Raw Materials, *International Journal of Analytical Chemistry*; 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2871579>
- [48]. S. Parham, A. Zargar Kharazi, H. Reza Bakhsheshi-Rad, H. Nur, A. Fauzi Ismail, S. Sharif, S. RamaKrishna, F. Berto, Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials, *Antioxidants*; 2020. DOI:10.3390/antiox9121309
- [49]. S. Khan, H. Shaheen, A. Mehmood, S. Nasar, T. Khan, Ethnobotanical and antibacterial study of *Primula* plants traditionally used in the indigenous communities of Western Himalaya, Pakistan, *Saudi Journal of Biological Sciences*; 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.048>
- [50]. Q. Najmus-Saqib, F. Alam, M. Ahmad, Antimicrobial and cytotoxicity activities of the medicinal plant *Primula macrophylla*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; 2009. 24(3): 697–701, DOI: 10.1080/14756360802333406
- [51]. <http://phytologio.blogspot.com/2018/03/daphne-oleoides-schreb.html>
- [52]. <https://www.greekflora.gr/el/flowers/0223/Daphne-oleoides>
- [53]. A. Vendittia, A. Maria Serrillia, M. Di Cecco, G. Ciaschetti, A. Bianco, Coumarins and other components of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides* from Majella National

Park, Biochemical Systematics and Ecology; 2019. 0305-1978,

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.013>

[54]. G. Moshiashvilia, N. Tabatadzeb , V. Mshvildadzec, The genus *Daphne*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Fitoterapia*; 2020. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104540

[55]. M. Riaz, A. Saleem, S. Siddique, B. Ahmad Khan, M. Nur-e-Alam, S. Shahzad-ul-Hussan, G. Abbas M. & M. Qayyum Khan, Phytochemistry of *Daphne oleoides*, *Natural Product Research*; 2016. 30:8, 880-897, DOI: 10.1080/14786419.2015.1092146

[56]. I. Atay Balkana, T. Taskımb, H. Tugba Dogan, I. Denizc, G. Akaydımd, E. Yesilada, A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of subextracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *Oleoides*, *Industrial Crops and Products*; 2017. 695–703, DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.11.038

[57]. A. Uysal, G. Zengin, A. Aktumsek, D. Rigano, F. Senatore & Murad Aydin Sanda, *Daphne oleoides*: An alternative source of important sesquiterpenes, *International Journal of Food Properties*; 2017. 20:3, 549-559, DOI: 10.1080/10942912.2016.1168836

[58]. S. Tariqa, S. Wania, W. Rasoola, K. Shafia, M.Ahmad Bhata, A. Prabhakarb, A. H. Shallaa, M. A. Rather, A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens, *Microbial Pathogenesis*; 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>

[59]. A. Alexopoulos, A.C. Kimbaris, S. Plessas, I. Mantzourani, I. Theodoridou, E. Stavropoulou, M.G. Polissiou, E. Bezirtzoglou, Antibacterial activities of essential oils

from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Anaerobe*; 2011. 399-402. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.024

[60]. T. M. Karpiński, Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals, *Biomolecules*; 2020. 10, 103, DOI:10.3390/biom10010103

[61]. G. Wittpahl, I. Kölling-Speer, S. Basche, E. Herrmann, M. Hannig, K. Speer, C. Hannig, The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*, *Planta Med*; 2015. 0032-0943, [http://dx.doi.org/ 10.1055/s-0035-1557822](http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1557822)

[62]. M.B. Lava, Uday. M. Muddapur, Nagaraj Basavegowda, Sunil.S. More, Veena S. More, Characterization, anticancer, antibacterial, anti-diabetic and anti-inflammatory activities of green synthesized silver nanoparticles using *Justica wynaadensis* leaves extract, *Materials Today: Proceedings*; 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.048>

[63]. Muddapur, U.M.; Alshehri, S.; Ghoneim, M.M.; Mahnashi, M.H.; Alshahrani, M.A.; Khan, A.A.; Iqbal, S.M.S.; Bahafi, A.; More, S.S.; Shaikh, I.A.; et al. Plant-Based Synthesis of Gold Nanoparticles and Theranostic Applications: A Review. *Molecules* 2022, 27, 1391. [https://doi.org/ 10.3390/molecules27041391](https://doi.org/10.3390/molecules27041391)

[64]. N. Soltani, J. Ebrahimian, M. Khayatkashani, N. Tavakkoli, M. Salavati-Niasari, *Salvia Officinalis* extract mediated for the synthesis of SO-MgO-NPs and their utilization for simultaneous measurement of dopamine, uric acid, and ascorbic acid by voltammetry method, *Journal of Molecular Liquids*; 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116932>

- [65]. S. A. Akintelu, B. Yao, A. S. Folorunso, Bioremediation and pharmacological applications of gold nanoparticles synthesized from plant materials, *Heliyon*; 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06591>
- [66]. G.E. Campillo, E. Vélez, G. Morales, C. Hincapié, J. Osorio, O. Arnache, J. I. Uribe, F. Jaramillo, Synthesis of Silver nanoparticles (AgNPs) with Antibacterial Activity, *Journal of Physics: Conference Series*; 2017. DOI:10.1088/1742-6596/850/1/012023
- [67]. M. Riaz, V. Mutreja, S. Sareen, B. Ahmad, M. Faheem, N. Zahid, G. Jabbour, J. Park, Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature, *Scientific Reports*; 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82555-z>
- [68]. S. Hun Lee, B. H. Jun, Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine, *International Journal of Molecular Sciences*; 2019. 20, 865. DOI:10.3390/ijms20040865
- [69].<https://hellanicus.lib.aegean.gr/bitstream/handle/11610/19776/%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20,%20%20.%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20%20.pdf?sequence=1>
- [70]. L. Soltani, M. Darbemamieh, Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Hydroethanolic Extract of Cucurbita pepo L. Fruit and Their Anti-proliferative and Apoptotic Activity Against Breast Cancer Cell Line (MCF-7), *Multidisciplinary Cancer Investigation*; 2021. DOI: 10.30699/mci.5.3.525-1
- [71]. M. Balouiri, M. Sadiki, S. Koraichi Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*; 2016. 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

- [72]. D. Kalembe, A. Kunicka, Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils, *Current Medicinal Chemistry*; 2003. 813-829
- [73]. M. E. Levison, J. H. Levison, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents, *Infectious Disease Clinics of North America*; 2009. 23(4): 791–vii. DOI: 10.1016/j.idc.2009.06.008
- [74]. D. Stagos, N. Portesis, C. Spanou, D. Mossialos, N. Aligiannis, E. Chaita, C. Panagoulis, E. Reri, L. Skaltsounis, A. M. Tsatsakis, D. Kouretas, Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, *Food and Chemical Toxicology*; 2012. 4115–4124 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>
- [75]. N. C. Sharma, S. V. Sahi, S. Nath, J. G. Parsons, J. L. Gardea- Torresdey, T. Pal, Synthesis of Plant-Mediated Gold Nanoparticles and Catalytic Role of Biomatrix-Embedded Nanomaterials, *Environmental Science and Technology*; 2007, 41, 5137-5142. DOI: 10.1021/es062929a