

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**



*Μυρτώ Χαρούλη*

**ΛΑΡΙΣΑ 2023**

*“Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ελληνικών μελιών μέσω αξιολόγησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού”*

*“Evaluation of the antioxidant activity of Greek honeys by assessing biomarkers of redox status in murine macrophage cells.”*

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Βεσκούκης Αριστείδης:** Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Σκαπέρδα Ζωή:** Εντεταλμένη διδάσκουσα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα πρωτίστως, να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση ενός ενδιαφέροντος θέματος διπλωματικής εργασίας, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βεσκούκη Αριστείδη και την Εντεταλμένη διδάσκουσα Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Σκαπέρδα Ζωή, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υπεύθυνη μου Πατούνα Αναστασία για την βοήθεια, το ενδιαφέρον, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις γνώσεις της, τόσο κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για τη φιλική διάθεση αλλά και την προθυμία να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι, το οποίο παράγεται κυρίως από την ευρωπαϊκή μέλισσα (*Apis mellifera*), δεν αποτελεί μόνο ένα φυσικό γλυκαντικό, αλλά διαθέτει επίσης, πλούσια ιστορία, ποικίλες χρήσεις και πολυάριθμα οφέλη για την υγεία. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον και μία στροφή του καταναλωτικού κοινού σε φυσικά προϊόντα, που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία. Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει σε αυξημένη ανάγκη των παραγωγών να πιστοποιήσουν τα προϊόντα τους ως προς τα ευεργετικά τους χαρακτηριστικά και συστατικά. Φυσικά προϊόντα, όπως το μέλι, που φαίνεται να διαθέτουν ευεργετικές ιδιότητες, έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, όσον αφορά τόσο τη σύσταση όσο και τον τρόπο δράσης τους. Για όλους τους παραπάνω λόγους, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση της επίδρασης τριών δειγμάτων μελιού μετά από επώαση 24 ωρών ενός μελιού δάσους με μελιτώματα και δύο ειδών ανθόμελου, στην κυτταρική βιωσιμότητα και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης (TAC, TBARS, Protein carbonyls και τα ενδογενή επίπεδα GSH και ROS μέσω κυτταρομετρίας ροής) μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7. Σε όλα τα δείγματα μελιού που αξιολογήθηκαν, παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης και της TAC αυξήθηκαν και στα τρία είδη μελιού, χωρίς η αύξηση αυτή να έχει στατιστική σημαντικότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις. Παράλληλα, όσον αφορά τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπήρχε μία τάση μείωσης των επιπέδων τους, ενώ η συγκέντρωση των TBARS, είτε μειώθηκε, είτε παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο με την ομάδα control. Γενικότερα, το μέλι μελιτώματος φάνηκε να επιδεικνύει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μέλια ανθέων.

## ABSTRACT

Honey, which is mainly produced by the European honeybee (*Apis mellifera*), is not only a natural sweetener, but also has a rich history, a variety of uses and numerous health benefits. In recent years, there has been an increased interest and a shift of the public to natural products that have not been processed. This has led to a high interest for producers to certify their products. In addition, natural products such as honey, which appear to have beneficial properties, have attracted the interest of the scientific community, both in terms of their composition and their mode of action. For all the reasons above, the aim of this thesis was to evaluate the effect of three honey samples after a 24-hour incubation, one forest honey with honeydew and two types of floral honey, on cell viability and biomarkers of redox status (TAC, TBARS, Protein carbonyls and endogenous GSH and ROS levels by flow cytometry) of RAW264.7 murine macrophage cells. Changes in the levels of redox biomarkers were observed in all honey samples evaluated. Intracellular levels of glutathione and TAC increased in all three types of honey and this increase wasn't statistically significant at all concentrations. At the same time, regarding the levels of free radicals, a tendency for them to decrease was shown, while the concentration of TBARS was either decreased or remained at the same level as the control group. In general, honeydew honey seemed to demonstrate a higher antioxidant capacity, when compared to flower honeys.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ .....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ABSTRACT .....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	6
ΕΙΚΟΝΕΣ.....	7
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ .....	8
ΠΙΝΑΚΕΣ .....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	9
1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών .....	9
1.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	10
1.3.1 Ενδογενείς πηγές.....	11
1.3.2. Εξωγενείς πηγές.....	14
1.4 Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών .....	14
1.4.1 Θετικές επιδράσεις.....	15
1.4.2. Αρνητικές επιδράσεις .....	15
1.5 Οξειδωτικό στρες.....	18
1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	19
1.6.1. Ενδογενή αντιοξειδωτικά .....	20
1.6.2. Εξωγενή αντιοξειδωτικά .....	23
1.7 Το μέλι.....	25
1.7.1. Το μέλι και άλλα προϊόντα της μέλισσας.....	25
1.7.2. Ιστορική αναδρομή.....	26
1.7.3. Διαδικασία παραγωγής μελιού .....	28
1.7.4. Είδη μελιού και ταυτοποίηση τους.....	29
1.7.5 Σύσταση του μελιού.....	30
1.7.6. Θερμιδική και θρεπτική αξία μελιού .....	37
1.7.7. Μέλι και υγεία .....	38
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	41
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
3.1 Δείγματα μελιού.....	42

3.2 Προετοιμασία διαλυμάτων.....	42
3.3 Κυτταρική σειρά RAW264.7.....	42
3.4 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς.....	43
3.5 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των ειδών μελιού.....	44
3.6 Αξιολόγηση της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.....	46
3.6.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford.....	47
3.6.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.....	48
3.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.....	49
3.6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.....	51
3.7 Εκτίμηση της επίδρασης δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής.....	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων διαφορετικών ειδών μελιού στην κυτταρική σειρά RAW264.7.....	56
4.2.1 Μέλι δάσους με μελιτώματα.....	57
4.2.2. Ανθόμελο 1.....	59
4.2.3. Ανθόμελο 2.....	60
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

## EΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1. Παράδειγμα ενός σταθερού μορίου και μιας ελεύθερη ρίζας (L. W. Evans & Omaye, 2017).....	9
Εικόνα 2. Ηλεκτρονιακές δομές των πιο κοινών ελεύθερων ειδών οξυγόνου (Zulfiqar & Ashraf, 2021)......	10
Εικόνα 3. Σχηματική παρουσίαση εξωγενών και ενδογενών πηγών δραστικών ειδών οξυγόνου (Sharifi-Rad et al., 2020)......	11
Εικόνα 4. Παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (Tirichen et al., 2021).....	12
Εικόνα 5. Παραγωγή ROS μέσω της φαγοκυττάρωσης (Andrade et al., 2022)......	13
Εικόνα 6. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Ranneh et al., 2017)......	14
Εικόνα 7. Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (E. P. P. Evans et al., 2021)......	16
Εικόνα 8. Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου (OH•) με τη γουανίνη (Valko et al., 2006)......	17

Εικόνα 9. Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας οδηγεί σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Kawamura & Muraoka, 2018). .....	19
Εικόνα 10. Η δράση του αντιοξειδωτικού (Jamshidi-kia et al., 2020).....	20
Εικόνα 11. Η Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγή της γλουταθειόνης.....	20
Εικόνα 12. Διαδικασία παραγωγής μελιού. ....	28
Εικόνα 13. Χημική σύσταση του μελιού (The Chemistry Of Honey - Emmett Royal Honey, 2022). ....	31
Εικόνα 14. Η επίδραση του μελιού στο μονοπάτι της απόπτωσης (Zammit Young & Blundell, 2023). ....	39
Εικόνα 15. Απεικόνιση καλλιέργειας RAW264.7 σε χαμηλή και υψηλή πυκνότητα(RAW 264.7 - TIB-71   ATCC, n.d.). ....	43
Εικόνα 16. Αναγωγή του XTT προς σχηματισμό προϊόντος φορμαζάνης. ....	44
Εικόνα 17. Κίνηση κυττάρων σε μονή σειρά ενώ αλληλεπιδρούν με την ακτίνα λέιζερ που συλλέγεται από ανιχνευτές(Principles of Flow Cytometry, n.d.).....	53
Εικόνα 18. Διαγράμματα διασποράς και ιστογράμματα όπως προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων GSH στην κυτταρική σειρά HepG2. Τα διαγράμματα της ομάδας ελέγχου ισχύουν για όλες τις συγκεντρώσεις του δείγματος. Τα διαγράμματα είναι αντιπροσωπευτικά ενός δείγματος μελιού βελανιδιάς. (Α)ομάδα ελέγχου, (Β) 25 mg/ml, (Γ) 12,5 mg/ml, (Δ) 6,25 mg/ml και (Ε) 3,125 mg/ml (Patouna et al., 2023). ....	55

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.....	48
Διάγραμμα 2. Η επίδραση όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων, όλων των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού (μέλι δάσους με μελιτώματα, ανθόμελο 1, ανθόμελο 2) στην κυτταρική βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς RAW 264.7. ....	57
Διάγραμμα 3. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού δάσους με μελιτώματα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7.*: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control (p < 0.05).....	58
Διάγραμμα 4. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του ανθόμελου 1 σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7. *: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control (p < 0.05).....	59
Διάγραμμα 5. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του ανθόμελου 2 σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7.....	60

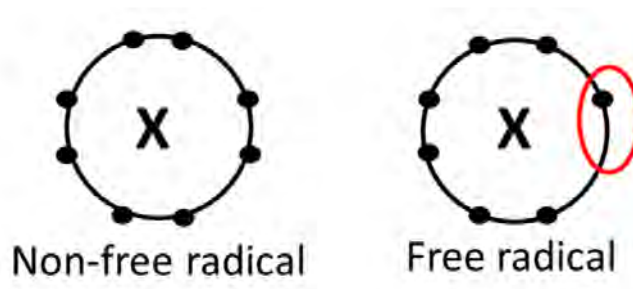
## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....	47
Πίνακας 2. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων. ....	49

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί κάθε άτομο ή μόριο, το οποίο είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και διαθέτει ένα ή και περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους του (εικόνα 1). Πολλές ρίζες είναι ασταθείς και ιδιαίτερα δραστικές. Μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο σε άλλα μόρια είτε να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες επομένως ως οξειδωτικά ή αναγωγικά (Di Meo & Venditti, 2020)(Phaniendra et al., 2015).



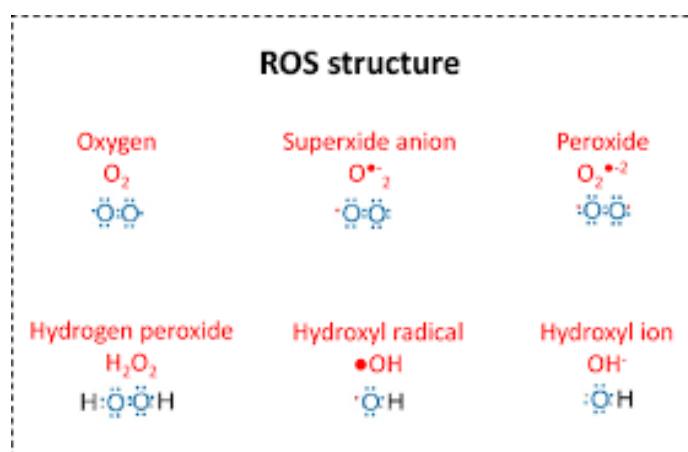
Εικόνα 1. Παράδειγμα ενός σταθερού μορίου και μιας ελεύθερης ρίζας (L. W. Evans & Omaye, 2017)

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές διεργασίες καθώς συμμετέχουν σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια. Ωστόσο, ανεξέλεγκτη δημιουργία των ελευθέρων ριζών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα κυτταρική βλάβη και διαταραχή της ομοιόστασης. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν και να οξειδώσουν όλα τα βασικά μακρομόρια όπως, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες (Lobo et al., 2010).

## 1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών

Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο ή τον άνθρακα. Τα μόρια που διαθέτουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο

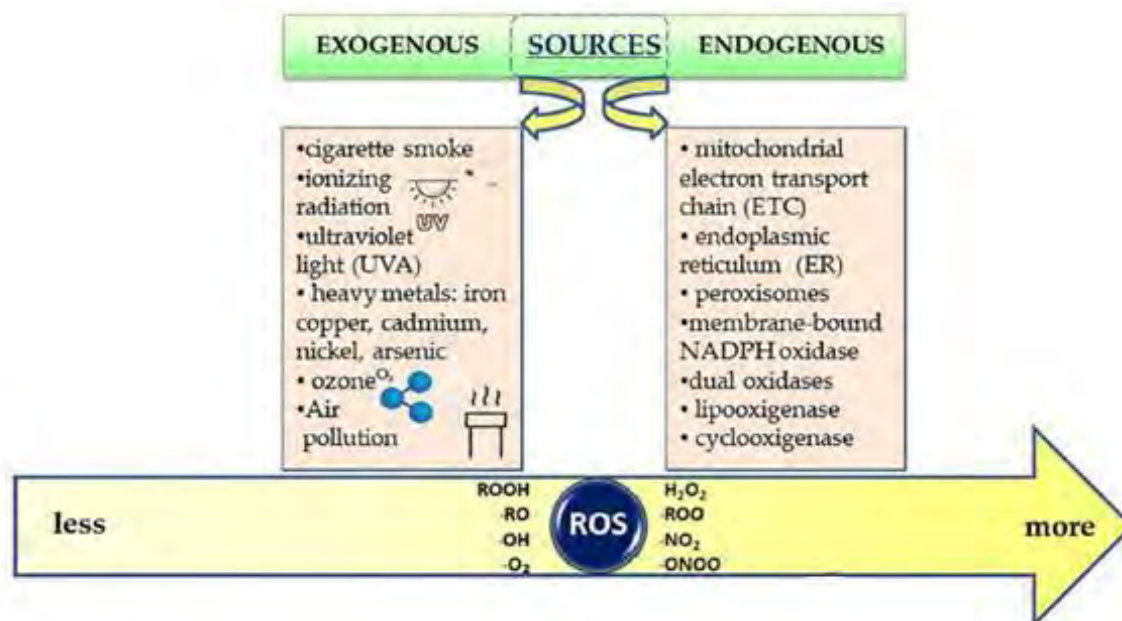
ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Ο συγκεκριμένος όρος είναι πιο γενικός και περιλαμβάνει τόσο τις ελεύθερες ρίζες αλλά και μόρια που δεν είναι ρίζες αλλά έχουν την ικανότητα να μετατραπούν σε ρίζες (Jamshidi-kia et al., 2020). Παραδείγματα των ROS, είναι η ρίζα του υδροξυλίου, του αλκοξυλίου, του σουπεροξειδίου, του περοξυλίου και του υδροπεροξυλίου, το όζον καθώς και μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (εικόνα 2). Αντίστοιχα δραστικά μόρια με κεντρικό μόριο το άζωτο καλούνται δραστικές μορφές αζώτου (RNS) περιλαμβάνοντας το μονοξειδίο και το διοξειδίο του αζώτου όσο και αζωτούχες ενώσεις μη ρίζες που είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες, όπως το νιτρώδες οξύ και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (Fang et al., 2002)(Halliwell & Gutteridge, 2015).



Εικόνα 2. Ηλεκτρονιακές δομές των πιο κοινών ελεύθερων ειδών οξυγόνου (Zulfiqar & Ashraf, 2021).

### 1.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες δύναται να αναπτυχθούν ενδογενώς στον οργανισμό, από ένα σύνολο ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιδράσεων. Επίσης ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από εξωγενείς πηγές, που προέρχονται από το περιβάλλον (εικόνα 3) (Sharifi-Rad et al., 2020).



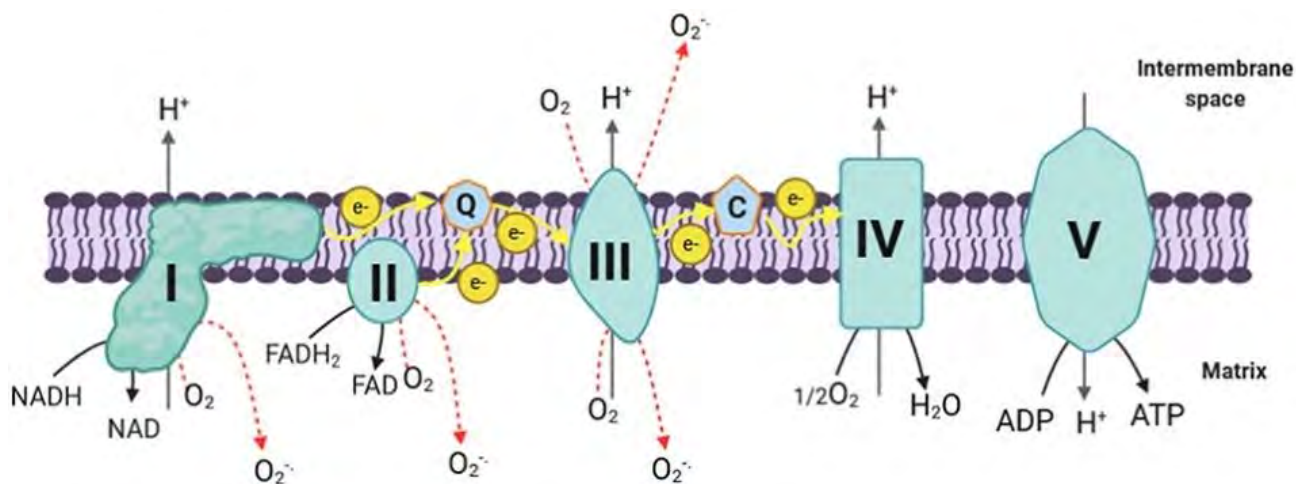
Εικόνα 3. Σχηματική παρουσίαση εξωγενών και ενδογενών πηγών δραστικών ειδών οξυγόνου (Sharifi-Rad et al., 2020).

### 1.3.1 Ενδογενείς πηγές

#### ❖ Αναπνευστική αλυσίδα

Στα μιτοχόνδρια παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας για τα κύτταρα καθώς εκεί συνδέεται η ενέργεια που παράγεται από την ροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα με την δημιουργία ATP. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται έχοντας ως τελικό αποδέκτη το οξυγόνο, το οποίο ανάγεται σε νερό και παράλληλα η ενέργεια που συσσωρεύεται κατά την μετακίνηση των πρωτονίων, χρησιμοποιείται από το σύμπλοκο V (ATP συνθάση) για την παραγωγή ATP (Zhao et al., 2019). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών, το σύμπλεγμα NADH διϋδρογενάσης (I), το σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c (III), το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c (IV) καθώς και από δύο ελεύθερα διαχεόμενα μόρια τα οποία είναι η ουβικινόνη και το κυτόχρωμα c. Όμως, κατά τη ροή ηλεκτρονίων υπάρχουν διαρροές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία  $O_2^{\bullet-}$  από τα σύμπλοκα I και III απευθείας στο μοριακό οξυγόνο το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  που παράγεται μπορεί να

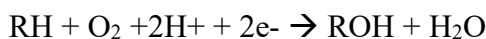
διαφύγει στο κυτταρόπλασμα και από εκεί να ενεργοποιήσει συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια (εικόνα 4) (Dan Dunn et al., 2015; Li et al., 2013; Zhao et al., 2019).



Εικόνα 4. Παραγωγή ROS μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας (Tirichen et al., 2021).

#### ❖ Κυτόχρωμα P450

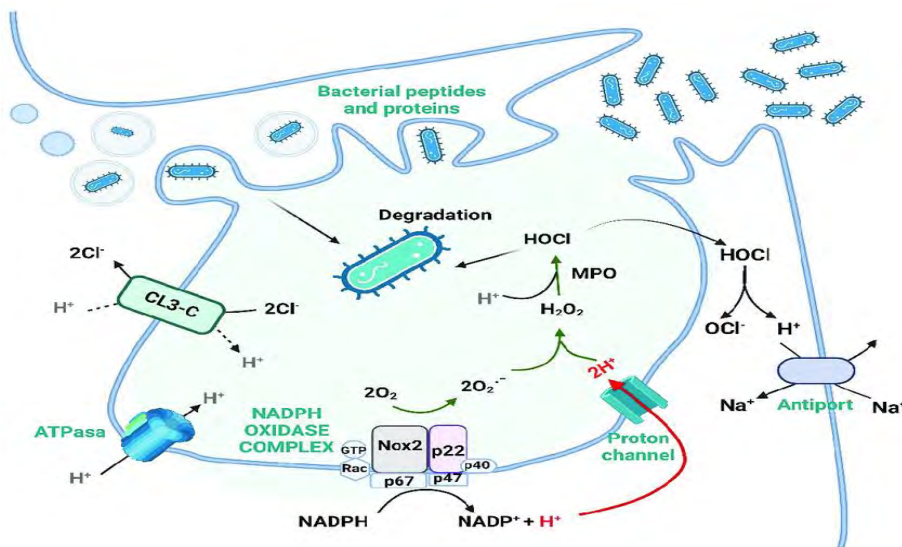
Σε κάποια κύτταρα (κυρίως στα ηπατικά), μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα P450 (CYPs) είναι μία υπεροικογένεια ενζύμων τα οποία περιέχουν αίμη ως συμπράγοντα και λειτουργούν ως μονοοξυγενάσες. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών. Ο κυριότερος μηχανισμός είναι η δέσμευση του οξυγόνου από μία μονοοξυγενάση και η χρήση ενός ατόμου για την υδροξυλίωση του υποστρώματος και του άλλου για την παραγωγή H<sub>2</sub>O, όπως φαίνεται παρακάτω :



Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την παραπάνω αντίδραση προέρχονται από το NADPH. Η διέλευση των ηλεκτρονίων από το NADPH πραγματοποιείται, είτε μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, είτε μέσω της P450 αναγωγάσης. Κατά τον καταλυτικό κύκλο του CYP παράγεται O<sub>2</sub><sup>•-</sup> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bae et al., 2011).

### ❖ Φαγοκυττάρωση

Η διέγερση των φαγοκυττάρων και, κατ' επέκταση, η ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης προκαλούνται από έναν μεγάλο αριθμό ουσιών καθώς και από τον τραυματισμό ενός ιστού. Όταν ενεργοποιηθεί η NADPH οξειδάση, η κατανάλωση  $O_2$  από το φαγοκύτταρο αυξάνεται δραματικά, ένα φαινόμενο το οποίο ορισμένες φορές καλείται “αναπνευστική έκρηξη” (respiratory burst) (Sugamura & Keaney, 2011). Λόγω της αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου παράγονται ελεύθερες ρίζες. Η NADPH οξειδάση παράγει  $O_2^{\bullet-}$  το οποίο μετατρέπεται σε  $H_2O_2$ . Εν συνεχεία το  $H_2O_2$  χρησιμοποιείται από την μυελοπεροξειδάση που βρίσκεται στα κοκκία των κυττάρων για την παραγωγή HOCl (εικόνα 5) (Dupré-Crochet et al., 2013; Moghadam et al., 2021).



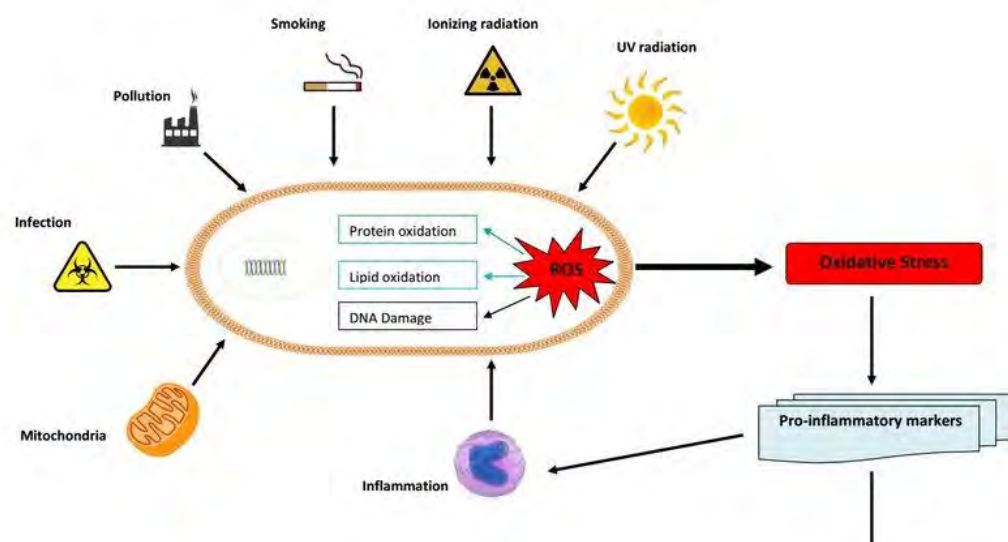
Εικόνα 5. Παραγωγή ROS μέσω της φαγοκυττάρωσης (Andrade et al., 2022).

### ❖ Οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μία φλαβοπρωτεΐνη η οποία περιέχει μόλυβδο και σίδηρο. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, ενώ παράλληλα ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$  (Battelli et al., 2016).

### 1.3.2. Εξωγενείς πηγές

Ελεύθερες ρίζες παράγονται και από εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση καθώς και ο καπνός του τσιγάρου. Επιπροσθέτως, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων και άλλων ξеноβιοτικών ουσιών όπως εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ. Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή. Κάθε ένας παράγοντας από τους παραπάνω, δύναται να αυξήσει τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, είτε μέσω της αύξησης της συγκέντρωσής τους στο κύτταρο, είτε μέσω της αναστολής της παραγωγής ή της δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων (εικόνα 6) (Sharifi-Rad et al., 2020).



Εικόνα 6. Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Ranneh et al., 2017).

## 1.4 Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Πλέον, θεωρείται οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν διπλό ρόλο στη βιολογία. Ανάλογα με την συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται μπορούν να συμμετέχουν σε

πολλές σημαντικές σηματοδοτικές αντιδράσεις και να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα. Όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν οξειδωτικό στρες και βλάβη στα μακρομόρια του κυττάρου.

### **1.4.1 Θετικές επιδράσεις**

Ήδη από την προηγούμενη δεκαετία, η επιστημονική κοινότητα έχει αναγνωρίσει ότι οι οργανισμοί δεν προσαρμόζονται απλά στην παρουσία των ελεύθερων ριζών, αλλά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να επωφελούνται από αυτές. Οι ελεύθερες ρίζες συμβάλουν σε πολλές βιοχημικές ενδοκυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, της έκφρασης γονιδίων και της αντιμετώπισης παθογόνων οργανισμών. Συγκεκριμένα, οι ROS και οι RNS ρυθμίζουν τη δράση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του παράγοντα NF-κB και του παράγοντα Nrf2, αλλά και την έκφραση γονιδίων και τη σήμανση πρωτεϊνικών κινασών. Συνεπώς, ανάλογα με την κυτταρική τοποθέτηση, την ποσότητα και τον τύπο οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ενεργούν είτε ως κινητήριες δυνάμεις είτε ως ανασταλτικοί παράγοντες σε κυτταρικές διεργασίες (Kaminsky & Zhivotovsky, 2014).

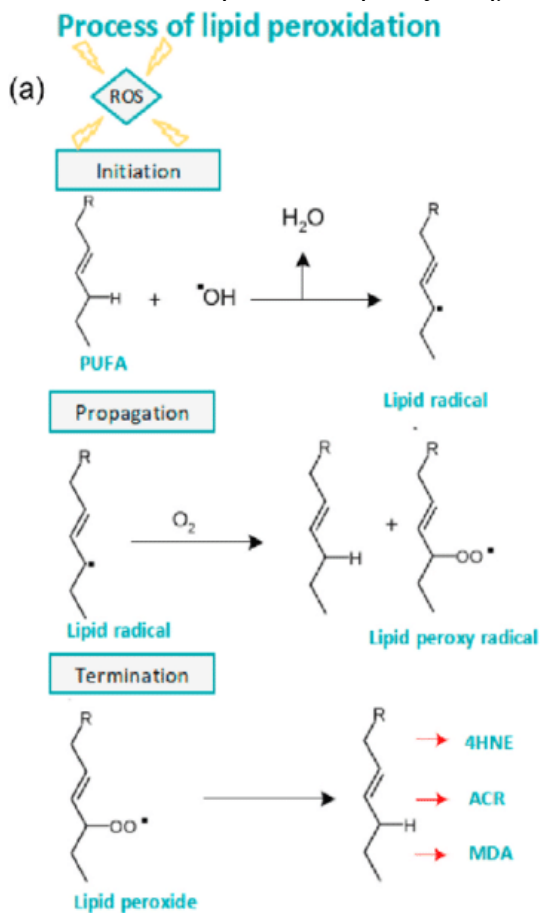
Πέραν αυτού, το υδροξείδιο του υδρογόνου και το μονοξείδιο του αζώτου εμπλέκονται στον έλεγχο του αγγειακού τόνου. Ειδικότερα, φαίνεται ότι αυτές οι δύο ενεργές μορφές ενεργοποιούν την γουανυλική κυκλάση, η οποία καταλύει τον σχηματισμό της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Το cGMP ρυθμίζει τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνικών κινασών, ιοντικών καναλιών και άλλων κυτταρικών στόχων που συμμετέχουν στον έλεγχο του αγγειακού τόνου και στην αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (Valko et al., 2007).

### **1.4.2 Αρνητικές επιδράσεις**

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου ξεκινά με την αναγωγή του οξυγόνου με ένα μονό ηλεκτρόνιο σε ανιόν του σουπεροξειδίου το οποίο μεταβολίζεται σε  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$ . Επιβάλλεται να τονιστεί ότι ούτε το  $O_2^{\bullet-}$  ούτε το  $H_2O_2$  αποτελούν ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες, αλλά χρειάζονται μηχανισμούς για να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες (Phaniendra et al., 2015).

### ❖ Υπεροξειδωση λιπιδίων

Ένας από τους στόχους των ελευθέρων ριζών είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και πιο συγκεκριμένα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που είναι συνδεδεμένα στα φωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. Το έναυσμα της συγκεκριμένης διαδικασίας μπορεί να προκληθεί από οποιαδήποτε ελεύθερη ρίζα, η οποία θα προκαλέσει την αφαίρεση ενός υδρογόνου από μία ομάδα μεθυλενίου. Η απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου οδηγεί στη δημιουργία μιας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα, η οποία αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ρίζας λιποειδικού υπεροξειδίου. Η ρίζα λιποειδικού υπεροξειδίου, δύναται να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μ' αυτόν τον τρόπο μια νέα ελεύθερη

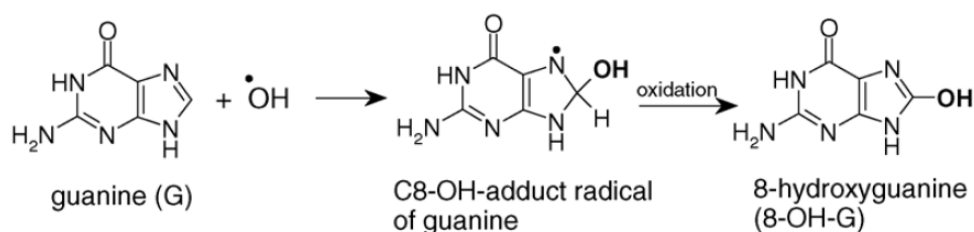


ρίζα και ένα υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος. Εν συνεχεία, τα υπεροξειδία των λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται, διασπώνται με αποτέλεσμα την παραγωγή πληθώρας προϊόντων ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην επέκταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων (εικόνα 7). Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα αποτελέσματα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες αφορούν κυρίως τη μείωση της ρευστότητας και την αύξηση της διαπερατότητάς τους σε μόρια όπως το  $\text{Ca}^{2+}$  και τα  $\text{H}^+$ , καθώς και την απενεργοποίηση κάποιων μεμβρανικών ενζύμων (Ayala et al., 2014; Nam, 2011).

Εικόνα 7. Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (E. P. P. Evans et al., 2021).

### ❖ Πρόκληση βλαβών στα νουκλεϊκά οξέα

Το DNA και το RNA, είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες, αφού καταλήγουν συχνά τόσο στην αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής, όσο και της μετάφρασης στη διαδικασία έκφρασης των πρωτεϊνών. Επίσης, προκαλούνται μεταλλάξεις, οι οποίες δυνητικά μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση ή την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι το μιτοχονδριακό DNA, λόγω του ότι βρίσκεται κοντά στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας και ελευθέρων ριζών συνδυαστικά με τη μικρή επιδιορθωτική του ικανότητα, είναι πιο ευαίσθητο σε πρόκληση βλαβών. Οι βλάβες που, συνήθως, προκαλούνται στο DNA, είναι τροποποιήσεις στις βάσεις του, θραύσεις στις έλικές του, βλάβες στις πουρίνες, την εξόξη και στο σύστημα επιδιόρθωσής του. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ρίζα υδροξυλίου η οποία αντιδρά με την γουανίνη στη θέση C8, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός οξειδωτικού προϊόντος, της 8- υδροξυγουανίνης (8-OHdG) (εικόνα 8). Η 8-υδροξυγουανίνη αποτελεί δείκτη οξείδωσης του DNA, ενώ συνήθως εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο μιτοχονδριακό συγκριτικά με το πυρηνικό DNA (Barzilai & Yamamoto, 2004; Dizdaroglu et al., 2002).



Εικόνα 8. Αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου (OH•) με τη γουανίνη (Valko et al., 2006).

### ❖ Πρόκληση βλαβών στις πρωτεΐνες

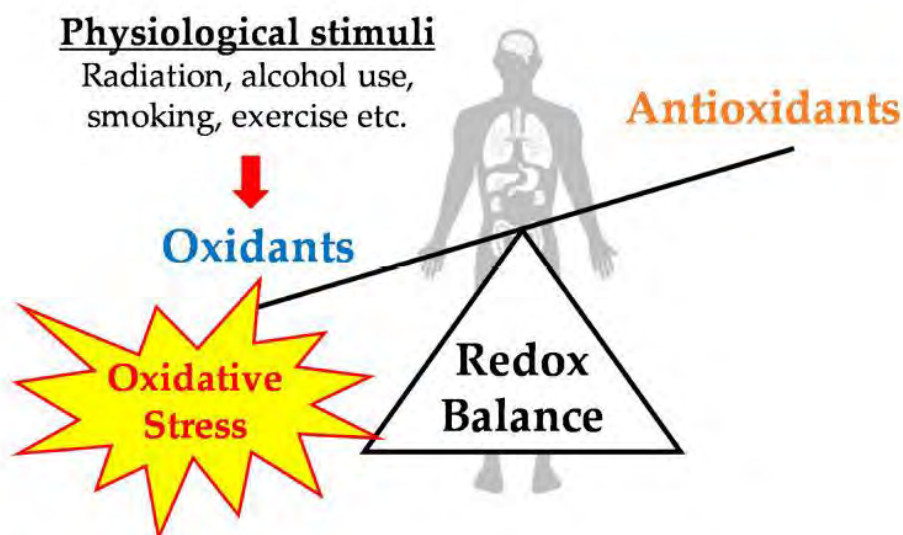
Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες δύναται να προκαλέσει τροποποίηση αμινοξέων, διάσπαση πεπτιδίων καθώς και σχηματισμό πρωτεϊνικών γεφυρών. Επίσης, η οξείδωση εξαρτάται από το είδος των αμινοξέων που περιέχουν οι πρωτεΐνες. Τα πιο ευάλωτα αμινοξέα στην οξείδωση, είναι κυρίως αυτά που περιέχουν θειούχες ομάδες και ακόρεστους δεσμούς (πχ κυστεΐνη, μεθειονίνη) (Lobo et al., 2010).

Ένα προϊόν της οξειδωσης των πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και αποτελούν δείκτη της προκαλούμενης από τις ελεύθερες ρίζες βλάβης σε αυτές(Salvi et al., 2001).

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονιστεί, πως η μη ελεγχόμενη οξειδωτική τροποποίηση ενζύμων, υποδοχέων, πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος είναι πιθανό να επιφέρει την πρόκληση ανωμαλιών στην γενικότερη λειτουργία του οργανισμού. Επιπροσθέτως, οξειδωτικές βλάβες οι οποίες προκαλούνται σε πρωτεΐνες μεταγραφής ή επιδιόρθωσης του DNA έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων(Griffiths et al., 2014).

## 1.5 Οξειδωτικό στρες

Σε κάθε βιολογικό σύστημα είναι θεμιτό να διατηρείται η ισορροπία ανάμεσα στον σχηματισμό και την εξουδετέρωση των ROS, καθώς οποιαδήποτε διαταραχή αυτής της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας είτε προς πιο υψηλές ή πιο χαμηλές τιμές επιφέρει μία κατάσταση στρες για τον οργανισμό (Pisoschi & Pop, 2015) (Veskoukis et al., 2012). Το οξειδωτικό στρες ορίστηκε αρχικά από τον Helmut Sies ως "διαταραχή στην ισορροπία των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ του πρώτου". Ο συγκεκριμένος ορισμός, έχει να κάνει με τη διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και τη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που διαθέτει ο οργανισμός. Λόγω της προόδου και της σύγχρονης έρευνας, ο Dean Jones το 2006 εισήγαγε έναν νέο ορισμό του οξειδωτικού στρες στην επιστημονική κοινότητα ως τη "διαταραχή προοξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ή/και σε μοριακή βλάβη" τονίζοντας έτσι την σημασία των ελευθέρων ριζών για την ομοιόσταση (εικόνα 9) (Schieber & Chandel, 2014; Veskoukis et al., 2020).



Εικόνα 9. Διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας οδηγεί σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Kawamura & Muraoka, 2018).

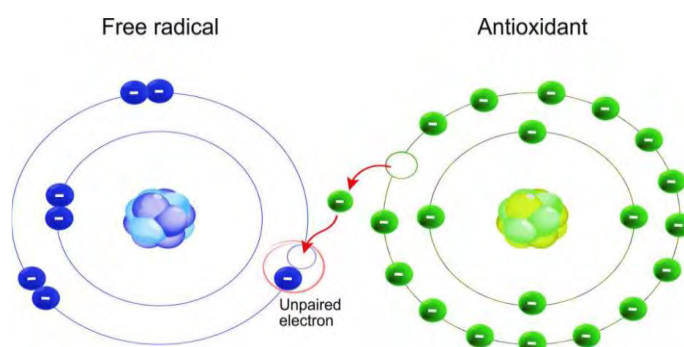
Οξειδωτικό στρες δύναται να προκληθεί είτε εξαιτίας της υπέρμετρης παραγωγής ελευθέρων ριζών είτε λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου. (Lichtenberg & Pinchuk, 2015).

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με μία πλειάδα ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος, η υπέρταση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι καρδιαγγειακές νόσοι και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Pham-Huy et al., 2008)(Jelic et al., 2021; Lorenzon Dos Santos et al., 2020; Teleanu et al., 2022; Zamudio-Cuevas et al., 2022).

## 1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται μία ουσία η οποία δύναται να δώσει το ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στιβάδας σε ένα μόριο το οποίο διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, εξουδετερώνοντας το (εικόνα 10). Η αντιοξειδωτική ουσία, βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και έχει την δυνατότητα να καθυστερεί ή να αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 2015)

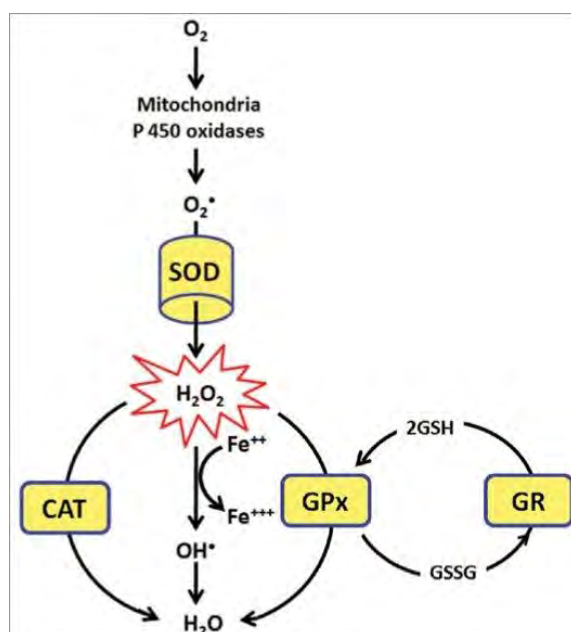
Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν μια ομάδα ουσιών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της οξειδωτικής ισορροπίας του οργανισμού και διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση τους: τα ενδογενή (παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό) και τα εξωγενή (προέρχονται κυρίως από τη διατροφή). Επιπλέον, τα ενδογενή αντιοξειδωτικά επιδέχονται περαιτέρω διαχωρισμό σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Η σύσταση και η διάρθρωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών διαφέρει όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ιστών αλλά ακόμα και μεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων του ίδιου ιστού (Aguilar et al., 2016).



Εικόνα 10. Η δράση του αντιοξειδωτικού (Jamshidi-kia et al., 2020).

### 1.6.1. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

#### I. ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ



Εικόνα 11. Η Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και καταλάση (CAT) είναι τα κύρια ενδογενή ενζυμικά συστήματα άμυνας όλων των αερόβιων κυττάρων (Pandey & Rizvi, 2010).

❖ Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Πρόκειται για ένα ένζυμο, το οποίο καταλύει την αντίδρασης μετατροπής του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και για το λόγο αυτό, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες θεωρείται ένζυμο πρώτης γραμμής της αντιοξειδωτικής άμυνας.



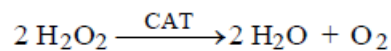
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της SOD:

1. η κυτταροπλασματική SOD1 (CuZnSOD)
2. η μιτοχονδριακή SOD2 (MnSOD)
3. η εξωκυττάρια SOD3 (ecSOD)

Κάθε μία από τις τρεις ισομορφές, αν και αποτελεί προϊόν διαφορετικών γονιδίων, καταλύει την ίδια ακριβώς αντίδραση. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μετατροπή του σουπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, απαιτείται η αναγωγή και επανοξείδωση ενός δραστικού μετάλλου μεταπτώσεως (π.χ. χαλκός ή μαγγάνιο), το οποίο βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

❖ Καταλάση (CAT)

Το ένζυμο καταλάση καταλύει την παρακάτω αντίδραση και έχει βρεθεί σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων.



Στα ζώα τη βρίσκουμε σε όλους τους ιστούς με υψηλότερη συγκέντρωση στο ήπαρ, ενώ ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι μύες έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Απαντάται συνήθως σε οργανίδια του κυττάρου που περιβάλλονται από μια απλή μεμβράνη και καλούνται υπεροξυσωμάτια. Επειδή η καταλάση χρησιμοποιεί το ίδιο μόριο ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) τόσο ως δότη όσο και ως δέκτη ηλεκτρονίων, δεν είναι δυνατός ο κορεσμός του ενζύμου όταν το υπόστρωμα βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

#### ❖ Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η κυριότερη αντίδρασή στην οποία συμμετέχει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αφορά τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$ , με ταυτόχρονη οξειδωση δύο μορίων γλουταθειόνης (GSH). Η GPx ενεργοποιείται όταν το  $H_2O_2$  βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με την καταλάση η οποία δρα όταν η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  είναι υψηλή. Το ένζυμο αυτό είναι απόλυτα εξειδικευμένο όσον αφορά τον δότη των ηλεκτρονίων (GSH), έχει όμως σε αντίθεση με την καταλάση την ικανότητα να ανάγει έναν μεγάλο αριθμό υπεροξειδίων, εκτός του  $H_2O_2$ . Για παράδειγμα, υποστρώματα της GPx αποτελούν, μεταξύ άλλων, οργανικά υπεροξειδία, υπεροξειδία λιπαρών οξέων και υπεροξειδία της χοληστερόλης. Είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο.

#### ❖ Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης καταλύει την αντίδραση της μετατροπής της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε ανηγμένη (GSH), διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα την αναλογία GSH/GSSG μέσα στο κύτταρο. Είναι ένα φλαβοένζυμο του οποίου η κάθε υπομονάδα περιέχει θέσεις δέσμησης για το NADPH αλλά και την GSSG. Η θέση δέσμησης της GSSG, σχηματίζεται και από τις δύο υπομονάδες, γεγονός που σημαίνει ότι το ένζυμο λειτουργεί ως ομοδιμερές. Αρχικά, το NADPH ανάγει το ένζυμο και έπειτα τα ηλεκτρόνια με τη σειρά τους μεταφέρονται και ανάγουν την GSSG. Η συγκεκριμένη διαδικασία, συμβάλλει στην διατήρηση ενός περιβάλλοντος με χαμηλά επίπεδα GSSG αλλά και επαρκή επίπεδα GSH.

## II. ΜΗ ENZYMIKA ANTIOΞEΙΔΩΤΙΚΑ

#### ❖ Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που συνίσταται από γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό. Είναι ένα υδρόφιλο αντιοξειδωτικό, που μπορεί να ανάγει και άλλα αντιοξειδωτικά όπως είναι οι

βιταμίνες C και E. Από την αναγωγή, προκύπτει η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης η οποία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ανάγεται ξανά σε GSH από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) βρίσκεται σε 10 – 100 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εσωτερικό του κυττάρου, συγκριτικά με την οξειδωμένη της μορφή. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και ένα μεγάλο ποσοστό του ενζύμου που παράγεται παραμένει εκεί, ενώ το υπόλοιπο διανέμεται στα μιτοχόνδρια, τον πυρήνα και το ενδοπλασματικό δίκτυο.

#### ❖ Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων που συμμετέχουν στην διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και συμβάλλει στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Aguilar et al., 2016).

### 1.6.2. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

#### ❖ Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Τα φυτά και τα περισσότερα ζώα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ασκορβικό οξύ από γλυκόζη, όχι όμως ο άνθρωπος και ορισμένα άλλα είδη ανώτερων θηλαστικών. Ως εκ τούτου, ο άνθρωπος είναι υποχρεωμένος να λαμβάνει τις αναγκαίες ποσότητες ασκορβικού οξέος μέσω της διατροφής του. Η βιταμίνη C είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, που λειτουργεί ως δότης ενός ηλεκτρονίου με σκοπό την εξουδετέρωση ή την μείωση της δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών. Η απώλεια του ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ρίζας ασκορβικού, η οποία είναι σχετικά μη δραστική και ανάγεται ενζυμικά σε ασκορβικό οξύ. Διαδραματίζει, πρωτεύοντα ρόλο στην προστασία από τις οργανικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες δημιουργούνται από ιονίζουσες ακτινοβολίες και, κατά συνέπεια, η παρουσία του είναι σημαντική για τον περιορισμό των βλαπτικών τους επιπτώσεων. Επιπροσθέτως, μεγάλο ενδιαφέρον έχει η δυνατότητα της βιταμίνης C να προάγει την αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών (GSH, βιταμίνη E).

### ❖ Βιταμίνη E

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυτταροπλασματική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, από την οξειδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ένας συνδυασμός τοκοφερολών, δύναται να έχει πιο ισχυρή ανασταλτική επίδραση όσον αφορά την υπεροξειδωση των λιπιδίων, συγκριτικά με την περίπτωση που η α- τοκοφερόλη δρα μόνη της. Αφού απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες, οι ρίζες τοκοφερόλης που σχηματίζονται είναι πιθανό είτε να οξειδώσουν άλλα λιπίδια, είτε να οξειδωθούν περαιτέρω προς κινόνες τοκοφερόλης ή να αναχθούν προς τοκοφερόλη με την βοήθεια άλλων αντιοξειδωτικών.

### ❖ Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και γενικά εμπλέκονται στην ενίσχυση της φυσικής άμυνα του φυτού καθώς και της προστασίας από εξωτερικούς παράγοντες (μικροβιακές μολύνσεις, υπεριώδης ακτινοβολία, κ.α.). Επίσης, βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και τα ποτά. Γενικά στα τρόφιμα δύναται, να συμβάλουν στην πικράδα, τη στυφή γεύση, το χρώμα, την οσμή αλλά και την οξειδωτική σταθερότητα. Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα είδη φυτών(Pandey & Rizvi, 2009)(Kouka et al., 2019). Διακρίνονται σε флаβονοειδή, φαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνες με βάση την πηγή προέλευσης, τη βιολογική τους λειτουργία και τη χημική δομή. Οι πιο κοινές πολυφαινόλες που συναντώνται στο μέλι αφορούν την ομάδα των флаβονοειδών και των φαινολικών οξέων(Cianciosi et al., 2018).

#### i. Φλαβονοειδή

Τα флаβονοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη υποομάδα των πολυφαινολών και απαντώνται σχεδόν σε όλα τα λαχανικά και τα φρούτα. Χωρίζονται σε υποκατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο υδροξυλίωσης στο δακτύλιο C, μερικές από τις οποίες είναι: ανθοκυανίνες, флаβόνες, ισοφλαβόνες, κ.α. (Fraga et al., 2019). Μπορούν να λειτουργήσουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά ρυθμίζοντας το οξειδωτικό στρες, μέσω της ικανότητας τους να αδρανοποιούν ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ελεύθερων ριζών(Su et al., 2019). Αρκετές κλινικές και ερευνητικές μελέτες έδειξαν

ότι τα φλαβονοειδή έχουν θετικές επιδράσεις τόσο στη θεραπεία, όσο και την πρόληψη διάφορων ασθενειών (Kawser Hossain et al., 2016).

## ii. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε 2 υποκατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C1-C6) και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (C3-C6). Συνήθως, συνδέονται με τα δομικά συστατικά του φυτού (κυτταρίνη, λιγνίνη), αλλά και με άλλα οργανικά μόρια, όπως γλυκόζη, άλλα σάκχαρα ή φλαβονοειδή. Βρίσκονται σε ποικίλα φυτικά τρόφιμα και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις περιέχονται στους σπόρους, τις φλούδες των φρούτων αλλά και τα φύλλα των λαχανικών (Kumar & Goel, 2019). Διαθέτουν, ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το καφεϊκό, το κουμαρικό και το γαλλικό οξύ τα οποία περιέχονται και στο μέλι (Becerril-Sánchez et al., 2021; Kaurinovic et al., 2019).

## ❖ Καροτενοειδή

Πρόκειται για μία ευρέως διαδεδομένη ομάδα βιοδραστικών ενώσεων, που βρίσκονται στα φυτά, και είναι υπεύθυνα για τα έντονα χρώματα πολλών φρούτων και λαχανικών (Pérez-Gálvez et al., 2020). Η αντιοξειδωτική τους δράση, οφείλεται τόσο στην ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών όσο και στην ικανότητα δέσμευσης του μοριακού οξυγόνου (Siti et al., 2015). Επίσης, πιθανόν να σχετίζονται και με το χρώμα του μελιού. Το μέλι που κανονικά έχει εξαιρετικά ανοιχτό χρώμα έχει συνήθως χαμηλά ποσοστά καροτενοειδών (Gül & Pehlivan, 2018).

## 1.7 Το μέλι

### 1.7.1. Το μέλι και άλλα προϊόντα της μέλισσας

Στα προϊόντα της κυψέλης περιλαμβάνονται το μέλι, η πρόπολη, ο βασιλικός πολτός, η γύρη και το κερί τα οποία παράγονται από τις μέλισσες και έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Πρωτεΐνες, πεπτίδια, μέταλλα, φλαβονοειδή, τερπένια, λιπαρά οξέα, και φαινολικές ενώσεις είναι κάποια από τα συστατικά που υπάρχουν στα προϊόντα των μελισσών (El-Seedi et al., 2021).

Το μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων από φυτά. Οι μέλισσες συλλέγουν το μέλι, το μετατρέπουν αναμειγνύοντάς το με ειδικές ύλες του σώματός τους, το αποθέτουν, το αφυδατώνουν, το εναποθηκεύουν και το φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσει (European Commission, 2002-Οδηγία 2001/110/EK).

Η πρόπολη είναι μια κολλώδης ουσία, που οι μέλισσες συλλέγουν από διάφορα φυτά, την εμπλουτίζουν με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες και με αυτήν στεγανοποιούν κι απολυμαίνουν το εσωτερικό της κυψέλης (Nainu et al., 2021).

Η γύρη των μελισσών είναι ένα μείγμα γύρης και νέκταρ λουλουδιών που συλλέγουν οι μέλισσες και αναμειγνύουν ως τροφή για την κυψέλη και σε αυτήν περιέχονται πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα, βιταμίνες και ανόργανα. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ως "υπερτροφή" και ένα από τα πιο πυκνά σε θρεπτικά συστατικά φυσικο συμπλήρωμα διατροφής (Thakur & Nanda, 2020).

Το κερί είναι το προϊόν που εκκρίνεται από τους κηρογόνους αδένες που η μέλισσα έχει στον θώρακά της. Το πλάθει με τα πόδια και τις σιαγόνες της για να χτίσει τις κηρήθρες (El-Seedi et al., 2021).

Τέλος, ο βασιλικός πολτός είναι ένα όξινο γαλάκτωμα που αποτελείται από λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και 60-70% νερό. Αποτελεί την αποκλειστική τροφή της βασίλισσας, αλλά και των προνυμφών που προορίζονται για βασίλισσες (Ahmad et al., 2020).

### **1.7.2. Ιστορική αναδρομή**

Η πρώτη εμφάνιση του μελιού θεωρείται ότι έλαβε χώρα πρώτη φορά τα προϊστορικά χρόνια. Αρχικά, η μέλισσα εμφανίστηκε στον πλανήτη Γη πριν από περίπου 65 εκατομμύρια χρόνια, δηλαδή χρονολογείται πολύ νωρίτερα από την εμφάνιση του ανθρώπου. Από τους προγόνους μας, εκτιμάται πως η συλλογή μελιού γινόταν με πέτρινες λεπίδες και άξονες προκειμένου να καταφέρουν να εισχωρήσουν στους κορμούς των δέντρων ώστε να φτάσουν τις κυψέλες των μελισσών όπου βρισκόταν το

μέλι. Τόσο στους αρχαίους αιγυπτιακούς όσο και σε κλασικούς πολιτισμούς (όπως είναι οι Ρωμαίοι και οι Έλληνες) το μέλι χρησιμοποιούνταν κατά κόρον σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα ακόμη και ως βαλσαμωτική ουσία (Martinello & Mutinelli, 2021).

Η παλαιότερη γραπτή αναφορά στη χρήση του μελιού είναι πιθανότατα αιγυπτιακή και χρονολογείται περίπου στο 5500 π.Χ., την εποχή που η Κάτω Αίγυπτος ονομαζόταν Γη των Μελισσών. Οι μέλισσες εμφανίζονται στο ναούς και στην τέχνη των τάφων της Αιγύπτου ήδη από το 3100.Π.Χ. Από τα πρώτα χρόνια, οι θεοί συνδέονταν με τις μέλισσες και μάλιστα, ένας από τους τίτλους των φαραώ ήταν "Βασιλιάς των μελισσών". Οι ναοί διατηρούσαν μέλισσες προκειμένου να ικανοποιήσουν την επιθυμία των θεών για μέλι αλλά και για την παραγωγή φαρμάκων και αλοιφών. Το μέλι ήταν μία από τις πρώτες μη ζωικές θυσίες. Στη Σουμερία και τη Μεσοποταμία, το μέλι μαζί με το βούτυρο προσφέρθηκε στον θεό Ningirsu από τον Gudea, τον ηγεμόνα του Λαγκάς, περίπου το 2500 π.Χ. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι όχι μόνο πρόσφεραν μέλι στους θεούς τους ως θυσία, αλλά το χρησιμοποιούσαν ως υγρό ταρίχευσης και ως επίδεσμο για πληγές (Kuropatnicki et al., 2018)(Kritsky & Kritsky, 2015).

Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι αναφορές που υπάρχουν για το μέλι, στον αρχαίο πολιτισμό των Μάγια, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν ως φαγητό ή ποτό αλλά και σε τελετές όπως η φύτευση καλαμπορκιού και η προσευχή για βροχή (Ortiz-Vázquez et al., 2016).

Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι όταν το μέλι λαμβάνεται τακτικά παρατείνει την ανθρώπινη ζωή. Ο Όμηρος, ο Πυθαγόρας, ο Οβίδιος και ο Δημόκριτος πίστευαν ότι οι άνθρωποι πρέπει να καταναλώνουν μέλι για να διατηρήσουν την υγεία και τη δύναμή τους ενώ και ο Ιπποκράτης, γνωστός ως ο πατέρας της σύγχρονης ιατρικής, κατέγραψε πολλές θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού (Kuropatnicki et al., 2018).

Στα νεότερα χρόνια, από τον 20ο αιώνα μέχρι και τη σημερινή εποχή, το μέλι χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε συνδυασμό με φαρμακευτικές θεραπείες έναντι πολλών παθήσεων και προβλημάτων υγείας. Τέλος, σήμερα, το μέλι αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής, η οποία έχει αναδειχθεί ως μία από τις ανώτερες διατροφές, με θετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου (Bogdanov et al., 2008).

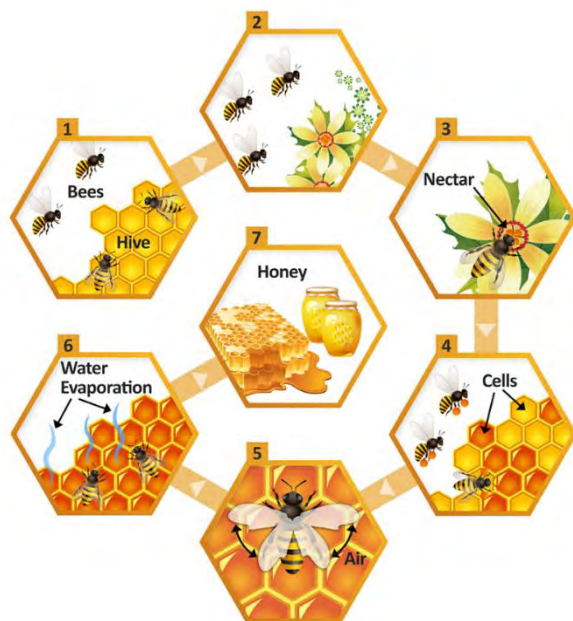
### 1.7.3. Διαδικασία παραγωγής μελιού

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν διατροφής γνωστό για την υψηλή θρεπτική του αξία καθώς και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Παρασκευάζεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera L.* οι οποίες χρησιμοποιούν είτε το νέκταρ των ανθών, είτε άλλες εκκρίσεις που συλλέγονται από τα ζωντανά μέρη των φυτών (μελίτωμα)(Patouna et al., 2023). Οι εκκρίσεις αυτές συλλέγονται από τα άνθη, αναμειγνύονται με το σάλιο της μέλισσας δημιουργώντας ένα νέο μίγμα και εν συνεχεία τοποθετούνται στην κυψέλη και αποθηκεύονται μέχρι να ωριμάσουν. Πιο αναλυτικά, η μέλισσα, μετακινείται από άνθος σε άνθος συλλέγοντας γύρη και κάνει μία πρώτη επεξεργασία, με τα πεπτικά ένζυμα που βρίσκονται στο στομάχι της. Τα ένζυμα αυτά, με κυριότερο την ιμβερτάση, καταλύουν την διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη (Viteri et al., 2021)

Μια μέλισσα μυρικά το νέκταρ για 20 λεπτά και ακολούθως, μεταφέρει το μίγμα στην επόμενη μέλισσα, μέσω μιας διαδικασίας παλινδρόμησης. φτύνει στο στόμα του. Το προϊόν που παράγεται μεταφέρεται από τις μέλισσες στα τοιχώματα της κηρήθρας, όπου οι μέλισσες με κινήσεις των φτερών τους, προκειμένου να μειωθεί η υγρασία του μίγματος σε επιθυμητά ποσοστά(16-17%) (εικόνα 12) (Ramsay et al., 2019).

Τέλος, και εφόσον το μίγμα έχει φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα υγρασίας, ακολουθεί η διαδικασία σφραγίσματος των κελιών της κηρήθρας. Η διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται με σκοπό να προστατευτεί το μέλι, και να είναι ασφαλές από μελλοντικές επιμολύνσεις (Hoover & Ovinge, 2018).

Γενικότερα, κατά την διαδικασία παραγωγής του, το μέλι αλλάζει σύσταση, μέχρι να φτάσει στην τελική του μορφή.



Εικόνα 12. Διαδικασία παραγωγής μελιού.

#### 1.7.4. Είδη μελιού και ταυτοποίηση τους

Η σύνθεση του μελιού συνδέεται στενά με τη βοτανική του προέλευση και τη γεωγραφική περιοχή συλλογής του. Το μέλι με βάση την προέλευση του κατηγοριοποιείται σε πολυανθικό και μονοανθικό. Το μέλι στο οποίο περιέχεται γύρη άνω του 50% της περιεκτικότητας του (κατόπιν γυρεοσκοπικής ανάλυσης) ονομάζεται μονοανθικό και διαθέτει διακριτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως ιδιαίτερα διακριτά αρώματα, που προέρχονται πιθανώς από το νέκταρ και θεωρείται προϊόν υψηλής ποιότητας (Schievano et al., 2016). Τα υπόλοιπα μέλια χαρακτηρίζονται ως πολυανθικά. Επιπλέον, ανεξαρτήτως της προηγούμενης κατηγοριοποίησης τα μέλια διαχωρίζονται σε νέκταρ και μέλι νέκταρ με μελιτώματα (Gül & Pehlivan, 2018; Villalpando-Aguilar et al., 2022). Τα μελιτώματα είναι είτε εκκρίσεις διαφόρων δέντρων, κυρίως κωνοφόρων και φυλλοβόλων δέντρων) είτε ζαχαρούχες εκκρίσεις των αφίδων, των λεπιδοπτέρων ή άλλων εντόμων που τρέφονται με χυμούς των δέντρων αυτών (Jonathan Chessum et al., 2022; Seraglio et al., 2021; Simova et al., 2012).

Η καταναλωτική ζήτηση για το μονοανθικό μέλι έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, επειδή παρέχει την δυνατότητα επιλογής χρώματος και γεύσης γνωρίζοντας το άνθος από το οποίο παράγεται, αυξάνοντας την εμπορική του αξία. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει νοθεύσεις με χαμηλού κόστους και διατροφικά πολύτιμες ουσίες ή εσφαλμένη επισήμανση όσον αφορά τη βοτανική προέλευση. Για να περιοριστούν τέτοια φαινόμενα, έχει ενισχυθεί η έρευνα για την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθοδολογιών και χημικών δεικτών που μπορούν να συμβάλουν στη διάκριση του μελιού, υποδεικνύοντας τη φυτική ή/και γεωγραφική προέλευση. Αυτοί θα επέτρεπαν την απόκτηση ενός προτύπου ποιότητας και γνησιότητας για το μέλι, προστατεύοντας τον καταναλωτή από την λανθασμένη επισήμανση κατώτερης ποιότητας μελιού (Bogdanov et al., 2004; Kaškonienė & Venskutonis, 2010; Machado et al., 2020).

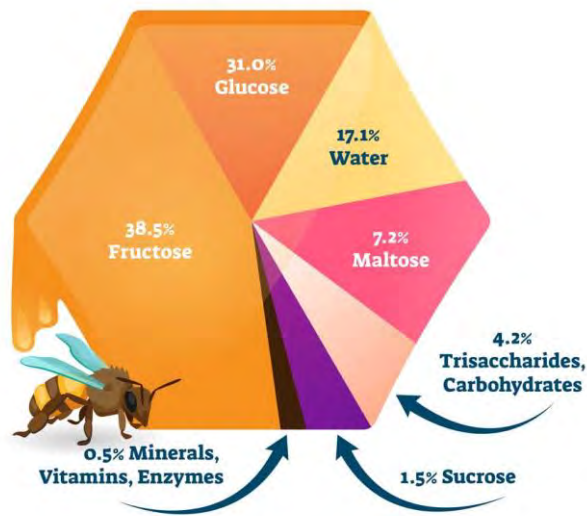
Η ανίχνευση της καθαρότητας αλλά και της αυθεντικότητας του μελιού, βασίζεται κυρίως στις ιδιότητες του και αποτελεί κύριο μέλημα και σημαντικό καθήκον για παραγωγούς, εμπόρους, καταναλωτές και ρυθμιστικές αρχές. Διάφορες αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αυθεντικοποίηση του μελιού, οι οποίες αφορούν φυσικοχημικές και μελισσοπαλινολογικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της βοτανολογικής προέλευσης του μελιού (Cianciosi et al., 2018; Kaczmarek et al., 2019).

Αναλυτικότερα, κάποιες φυσικοχημικές παράμετροι από τις οποίες μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες όσον αφορά την προέλευση του μελιού είναι η περιεκτικότητα των σακχάρων, η ενζυματική δραστηριότητα, το pH, η προλίνη, το ποσοστό υγρασίας, καθώς και τα ελεύθερα οξέα. Οι συγκεκριμένες παράμετροι επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από τα είδη των ανθέων που επισκέπτονται οι μέλισσες, όπως επίσης και από την εποχή του έτους, τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν τη δεδομένη χρονική στιγμή, αλλά και από τη γεωγραφική περιοχή στην οποία παράγεται το μέλι (Bertoncelj et al., 2011; Cianciosi et al., 2018). Επίσης, η μελισσοπαλινολογική ανάλυση αφορά τη μικροσκοπική ανάλυση των γυρεόκοκκων, δηλαδή των ιζημάτων του μελιού (Bentabol Manzanares et al., 2017).

### **1.7.5 Σύσταση του μελιού**

Το μέλι είναι ένα πολύπλοκο μείγμα ενώσεων με εξαιρετικά σταθερή συνολική σύνθεση, που αποτελείται κυρίως από νερό (περίπου 17-20%) και ένα μείγμα σακχάρων, κυρίως γλυκόζης και φρουκτόζης, τα οποία μαζί αποτελούν περίπου το 70-80% του περιεχομένου του. Αυτά τα σάκχαρα προσδίδουν στο μέλι τη γλυκύτητά του και δρουν ως συντηρητικά μειώνοντας τη δραστηριότητα του νερού. Εκτός από τα σάκχαρα, το μέλι περιέχει μια ποικιλία δευτερευόντων συστατικών, όπως οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, ένζυμα, βιταμίνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικά (εικόνα 13) (Alvarez-Suarez et al., 2013). Η μοναδική γεύση και το άρωμα του μελιού αποδίδονται σε πτητικές οργανικές ενώσεις, όπως τερπένια, φαινόλες και αλδεΐδες. Η συγκεκριμένη σύνθεση του μελιού μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την πηγή του ανθού, τη γεωγραφική θέση και τις μεθόδους επεξεργασίας, οι οποίες συμβάλλουν στις ποικίλες οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες που παρατηρούνται στις διάφορες ποικιλίες μελιού. Η παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό καθιστούν επίσης το μέλι φυσικά ανθεκτικό στη φθορά, αυξάνοντας την ελκυστικότητά του ως τρόφιμο και πιθανό φαρμακευτικό προϊόν. Η μελέτη των συστατικών του μελιού μας δίνει πολλές πληροφορίες για την ταυτότητα του και την ποιοτική του ταξινόμηση, παράμετροι που αυξάνουν ή μειώνουν την εμπορική και ποιοτική του αξία (Al-Kafaween et al., 2023).

## COMPOSITION OF HONEY



Εικόνα 13. Χημική σύσταση του μελιού (The Chemistry Of Honey - Emmett Royal Honey, 2022).

### ❖ Σάκχαρα

Το μέλι είναι ένα πολύπλοκο μίγμα σακχάρων το οποίο περιέχει μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, δισακχαρίτες όπως η σουκρόζη και η μαλτόζη, αλλά και πιο σύνθετα σάκχαρα (π.χ. ισομαλτόζη, ισομαλτοτριόζη, μαλτοτριόζη, λακτουλόζη, μελιβιόζη και άλλα). Πολλά από τα παραπάνω σάκχαρα δεν βρίσκονται αρχικά στο νέκταρ, αλλά σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και αποθήκευσής του μελιού, λόγω της επίδρασης των ενζύμων της μέλισσας (Da Silva et al., 2016).

Τα κύρια σάκχαρα του μελιού είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, τα οποία μαζί αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα, που συνήθως κυμαίνεται από 70% έως 80%. Αυτοί οι μονοσακχαρίτες απορροφώνται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό και είναι υπεύθυνοι για τη γλυκύτητα του μελιού. Η ισορροπία μεταξύ γλυκόζης και φρουκτόζης μπορεί να διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών μελιού, συμβάλλοντας σε διαφορές στη γεύση και την υφή (Nguyen et al., 2019). Για παράδειγμα, το μέλι με υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκόζη μπορεί να κρυσταλλώνεται πιο γρήγορα και να έχει πιο πυκνή σύσταση, ενώ το μέλι με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φρουκτόζη τείνει να παραμένει υγρό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η διαφοροποίηση αυτή επηρεάζεται από παράγοντες

όπως η ανθική πηγή του νέκταρ, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και τα είδη μελισσών που συμμετέχουν στην παραγωγή του μελιού (Bentabol Manzanares et al., 2017).

Εκτός από γλυκόζη και φρουκτόζη, το μέλι περιέχει επίσης μικρότερες ποσότητες άλλων σακχάρων, όπως μαλτόζη και σακχαρόζη. Η παρουσία αυτών των σακχάρων προσθέτει πολυπλοκότητα στο γευστικό προφίλ του μελιού και μπορεί να συνεισφέρει λεπτές διαφορές στη γεύση, καθιστώντας το μέλι ένα ποικίλο και δυναμικό γαστρονομικό συστατικό. Επιπλέον, η μοναδική σύνθεση σακχάρων του μελιού, σε συνδυασμό με τη χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό και το όξινο pH του, του παρέχει φυσικές συντηρητικές ιδιότητες, καθιστώντας το ανθεκτικό στη φθορά και την ανάπτυξη μικροβίων (Da Silva et al., 2016; Nguyen et al., 2019).

#### ❖ Πρωτεΐνες και αμινοξέα

Η περιεκτικότητα του μελιού σε πρωτεΐνες είναι σχετικά χαμηλή, συνήθως κυμαίνεται από 0,1% έως 0,5% της συνολικής του σύνθεσης. Η πρωτεϊνική σύνθεση του μελιού είναι ποικίλη, με παρουσία διαφόρων ενζύμων, αναστολέων ενζύμων και δευτερευουσών πρωτεϊνών. Έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια στο μέλι μπορούν να υποδεικνύουν τη γεωγραφική προέλευση αφού η περιεκτικότητα του μελιού σε πρωτεΐνες ποικίλλει ανάλογα με το είδος τόσο των ανθέων όσο και των μελισσών (Wang & Li, 2011).

Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και υπάρχουν επίσης στο μέλι, αν και σε πολύ μικρές ποσότητες. Το μέλι περιέχει συνήθως περίπου 0,1% έως 0,5% αμινοξέα. Η συγκεκριμένη σύνθεση αμινοξέων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη φυτική πηγή του νέκταρ και τις μεθόδους επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται. Τα συνήθη αμινοξέα που βρίσκονται στο μέλι περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την προλίνη, τη φαινυλαλανίνη, την αλανίνη και τη λυσίνη (Israili, 2014).

#### ❖ Οργανικά οξέα

Το μέλι περιέχει συνήθως μια ποικιλία οργανικών οξέων, με το γλυκονικό οξύ να είναι ένα από τα πιο άφθονα. Οι μέλισσες παράγουν γλυκονικό οξύ μετατρέποντας ενζυματικά τη γλυκόζη, ένα σημαντικό σάκχαρο του μελιού, σε αυτό το οργανικό οξύ.

Το γλυκονικό οξύ είναι υπεύθυνο για το ελαφρώς όξινο pH του μελιού, το οποίο συνήθως κυμαίνεται από 3,2 έως 4,5(Aurongzeb & Azim, 2011). Αυτή η οξύτητα συμβάλλει στη χαρακτηριστική πικάντικη γεύση του μελιού, αλλά έχει σημαντικό ρόλο στη φυσική διατήρησή του, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και μικροοργανισμών. Επιπλέον, το γλυκονικό οξύ συμμετέχει στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου εντός του μελιού, το οποίο ενισχύει περαιτέρω τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες(Bonsignore et al., 2021). Εκτός από το γλυκονικό οξύ, το μέλι περιέχει και άλλα οργανικά οξέα σε ίχνη, όπως είναι το οξικό, βουτυρικό, κιτρικό, γαλακτικό, μηλικό και οξαλικό οξύ, μεταξύ άλλων. Αυτά τα οργανικά οξέα συμβάλλουν συλλογικά στο σύνθετο γευστικό προφίλ του μελιού, προσθέτοντας διακριτική οξύτητα και βελτιώνοντας τη συνολική του γεύση(Israili, 2014).

Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτά τα οργανικά οξέα, μαζί με τα φυτοχημικά που βρίσκονται στο μέλι, μπορεί να προσφέρουν πιθανά οφέλη για την υγεία. Για παράδειγμα, μπορεί να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, να συμβάλλουν στην αντιφλεγμονώδη δράση του μελιού και να βοηθούν στη βελτίωση της πέψης του. Η περιεκτικότητα του μελιού σε οργανικά οξέα ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες όπως η πηγή των λουλουδιών, η γεωγραφική προέλευση και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, καθιστώντας το μέλι ένα ποικιλόμορφο και δυναμικό προϊόν. Επιπροσθέτως, τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των μελιών ανάλογα με τις βοτανική ή/και γεωγραφική προέλευση(Da Silva et al., 2016).

#### ❖ Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει επίσης ίχνη βιταμινών, οι οποίες συμβάλλουν στη θρεπτική του αξία. Η περιεκτικότητα του μελιού σε βιταμίνες είναι σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα, και οι συγκεντρώσεις τους ελάχιστα καλύπτουν τις καθημερινές απαιτήσεις. Το μέλι περιέχει συνήθως μικρές ποσότητες διαφόρων βιταμινών του συμπλέγματος Β, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών Β1 (θειαμίνη), Β2 (ριβοφλαβίνη), Β3 (νιασίνη), Β5 (παντοθενικό οξύ), Β6 (πυριδοξίνη) και Β9 (φυλλικό οξύ). Περιέχει επίσης ίχνη βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ), η οποία είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες και το ρόλο της στην υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος(Afzin et al., 2020). Επιπλέον, οι βιταμίνες του μελιού μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με παράγοντες όπως η πηγή των λουλουδιών, η γεωγραφική τοποθεσία και οι μέθοδοι

επεξεργασίας. Ενώ το μέλι δεν αποτελεί πρωταρχική πηγή βιταμινών, ο μοναδικός συνδυασμός θρεπτικών συστατικών του, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των αντιοξειδωτικών, των ιχνοστοιχείων και των βιταμινών, συμβάλλει στη φήμη του ως φυσικό γλυκαντικό με πιθανά οφέλη για την υγεία, όταν καταναλώνεται με μέτρο (Zawawi et al., 2021).

#### ❖ Μέταλλα και ιχνοστοιχεία

Τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στο μέλι παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατροφική του σύνθεση, συμβάλλοντας τόσο στο γευστικό του προφίλ όσο και στα πιθανά οφέλη για την υγεία. Το μέλι περιέχει αρκετά βασικά μέταλλα, όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορο και νάτριο. Το μέλι περιέχει επίσης μια σειρά από ιχνοστοιχεία συστατικά, όπως σίδηρο, χαλκό, ψευδάργυρο, σελήνιο και χρώμιο, μεταξύ άλλων. Ενώ αυτά τα ιχνοστοιχεία υπάρχουν στο μέλι σε ελάχιστες ποσότητες, προσθέτουν στη συνολική διατροφική αξία του μελιού (Da Silva et al., 2016).

#### ❖ Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια ποικίλη ομάδα φυσικών οργανικών ενώσεων που βρίσκονται σε διάφορες φυτικές τροφές, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των λαχανικών, των δημητριακών ολικής αλέσεως και ποτών όπως το τσάι και το κόκκινο κρασί. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και έχουν συγκεντρώσει σημαντική προσοχή για τα πιθανά οφέλη τους για την υγεία. Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων, των λιγνάνων και των στυλβενίων, καθένα από τα οποία έχει τη μοναδική χημική δομή και βιολογική δραστηριότητα (Pandey & Rizvi, 2009).

Συναντώνται ευρέως στα φυτά, καθώς λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα φυτά διαθέτουν αρκετά πολυφαινολικά παράγωγα με μεγάλη δομική ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, και όταν οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ, αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να μεταφερθούν από τα φυτά στο μέλι (Nascimento et al., 2018).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια κατηγορία φυσικών οργανικών ενώσεων που απαντώνται και στο μέλι, συμβάλλοντας στη χαρακτηριστική γεύση, το χρώμα και τα πιθανά οφέλη για την υγεία. Το μέλι είναι πλούσια πηγή διαφόρων φαινολικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και άλλων πολυφαινόλων. Η εκάστοτε φαινολική σύνθεση του μελιού μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με παράγοντες όπως η πηγή των λουλουδιών, η γεωγραφική θέση και οι μέθοδοι επεξεργασίας (Bogdanov et al., 2008).

Μια από τις βασικές φαινολικές ομάδες του μελιού είναι τα φλαβονοειδή, τα οποία είναι γνωστά για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές προστατεύουν το μέλι από την οξείδωση, εξασφαλίζοντας τη μεγάλη διάρκεια ζωής του. Τα κοινά φλαβονοειδή που βρίσκονται στο μέλι περιλαμβάνουν την κερκετίνη, την καμφερόλη, την απιγενίνη και τη μυρικετίνη. Αυτά τα φλαβονοειδή έχουν συσχετιστεί με διάφορα οφέλη για την υγεία (Nguyen et al., 2019).

Τα φαινολικά οξέα, μια άλλη σημαντική ομάδα φαινολικών ενώσεων στο μέλι, περιλαμβάνουν το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και το γαλλικό οξύ. Αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στη μοναδική γεύση του μελιού και μπορεί να έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, άλλες πολυφαινόλες, όπως η ρεσβερατρόλη, μια γνωστή ένωση που βρίσκεται στο κόκκινο κρασί, έχουν ανιχνευθεί στο μέλι, αν και σε μικρότερες ποσότητες. Αυτές οι πολυφαινόλες μπορούν να συμβάλουν στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού και μπορεί να προσφέρουν πιθανά οφέλη για την υγεία, αν και η έρευνα στον τομέα αυτό βρίσκεται σε εξέλιξη. Συνολικά, η παρουσία φαινολικών ενώσεων στο μέλι προσθέτει στη διατροφική του αξία και ενισχύει τη φήμη του ως φυσικό, προαγωγικό για την υγεία γλυκαντικό με ποικίλα και δυναμικά γευστικά προφίλ (Sergiel et al., 2014) (Heleno et al., 2015).

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανθολογικοί δείκτες και έχουν αυξήσει επίσης το ενδιαφέρον για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που αποδίδεται στις ενώσεις αυτές λόγω της ικανότητάς τους να απομακρύνουν ή να μειώνουν το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών (Da Silva et al., 2016).

#### ❖ Ένζυμα

Στο μέλι υπάρχουν πολλά ένζυμα και το καθένα συμβάλλει σε συγκεκριμένες βιοχημικές διεργασίες εντός της κυψέλης και στη σύνθεση του μελιού. Τα κύρια ένζυμα του μελιού είναι η ιμπερτάση, η οξειδάση της γλυκόζης και η διαστάση και πρέπει να σημειωθεί ότι και τα τρία αυτά ένζυμα παράγονται στους υποφαρυγγικούς αδένες των εργατριών μελισσών(Bogdanov et al., 2008; Olaitan et al., 2007). Αναλυτικότερα για τα κύρια ένζυμα του μελιού:

1. **Ιμπερτάση:** Η ιμπερτάση είναι ένα από τα βασικά ένζυμα του μελιού και παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Η μετατροπή τους σε απλούστερα σάκχαρα καθιστούν το μέλι γλυκό(chahra et al., 2020).
2. **Οξειδάση της γλυκόζης:** Οι μέλισσες παράγουν αυτό το ένζυμο, το οποίο μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η παρουσία του γλυκονικού οξέος συμβάλλει στο όξινο pH του μελιού, το οποίο συμβάλλει στη συντήρησή του αναστέλλοντας την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων και μικροοργανισμών. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ένας άλλος αντιμικροβιακός παράγοντας που παράγεται κατά τη διαδικασία αυτή, προσθέτει στις φυσικές συντηρητικές ιδιότητες του μελιού. Η δράση της οξειδάσης της γλυκόζης, μειώνεται καθώς αυξάνουν τα σάκχαρα κατά την ωρίμαση του μελιού, έως ότου σταματήσει με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης, για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας του μελιού(chahra et al., 2020; Israili, 2014; Tashkandi, 2021)(Bogdanov et al., 2008; Israili, 2014).
3. **Διαστάση:** Η διαστάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο μέλι, αν και σε ελάχιστες ποσότητες. Συμμετέχει στη διάσπαση σύνθετων σακχάρων σε απλούστερα σάκχαρα, όπως η μαλτόζη, η οποία προσθέτει στην ποικιλομορφία των σακχάρων που υπάρχουν στο μέλι. Δε φαίνεται να λαμβάνει μέρος σε χημικές διεργασίες κατά την παραγωγή του μελιού. Η σημασία της στις αναλύσεις μελιών έγκειται στο γεγονός ότι είναι πολύ θερμοευαίσθητη, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης θερμικής επεξεργασίας του μελιού(Israili, 2014; Seraglio et al., 2021).

4. Καταλάση: Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που συμβάλλει στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται κατά τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Η παρουσία της είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί ότι το μέλι δεν συσσωρεύει υπερβολικά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου, τα οποία θα μπορούσαν να είναι επιζήμια για την υγεία των μελισσών.

#### ❖ Νερό

Αρχικά, η ποσότητα του νερού που θα παραμείνει στο μέλι εξαρτάται από την ωρίμανση του, από την αρχική υγρασία και από τον ρυθμό έκκρισης του νέκταρ, αλλά και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά την διάρκεια της παραγωγής, όπως την κατάσταση του καιρού. Τα επίπεδα υγρασίας σχετικά με το μέλι, μπορεί να αλλάξουν λόγω της έκθεσης του μελιού σε ξηρή ή υγρή ατμόσφαιρα κατά τη διαδικασία του τρύγου. Επίσης, εξαιτίας της υγροσκοπικότητας του μελιού, η υγρασία αλλάζει κατά την αποθήκευση ανάλογα με τις συνθήκες αυτές.

Η υγρασία στο μέλι αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στις φυσικοχημικές του ιδιότητες όσο και στην «συμπεριφορά» του μελιού μετά την συγκομιδή και τη συσκευασία του. Ιδιότητες όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση και το ιξώδες, εξαρτώνται άμεσα από το νερό που περιέχεται στο μέλι (Aurongzeb & Azim, 2011; De-Melo et al., 2017; Olaitan et al., 2007).

### **1.7.6. Θερμιδική και θρεπτική αξία μελιού**

Το μέλι παρέχει ενέργεια ίση περίπου με 304 kcal/ 100 gr, ανάλογα πάντα και με το είδος του. Ωστόσο, η σωστή και ακριβής, τεκμηρίωση της θρεπτικής του αξίας είναι μία δύσκολη διαδικασία, δεδομένου ότι στο μέλι εμπεριέχονται πάνω από 180 συστατικά και παράλληλα είναι ένα προϊόν το οποίο δεν επιδέχεται επεξεργασία.

Ο άνθρωπος προκειμένου να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες, χρησιμοποιεί την γλυκόζη, η οποία μπορεί να προέρχεται από το μέλι ή την ζάχαρη (Khan et al., 2007).

Έχει χαμηλότερο γλυκαιμικό δείκτη (GI) σε σύγκριση με την επιτραπέζια ζάχαρη, που σημαίνει ότι έχει πιο αργή και σταθερή επίδραση στα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Αυτό μπορεί να είναι ευεργετικό για τα άτομα με διαβήτη όταν καταναλώνεται με μέτρο.

### 1.7.7. Μέλι και υγεία

#### ❖ Αντικαρκινική δράση

Η πιθανή αντικαρκινική δράση του μελιού έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον, αν και η έρευνα στον τομέα αυτό είναι συνεχής και πολύπλοκη. Το μέλι περιέχει ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων που έχουν επιδείξει διάφορες αντικαρκινικές ιδιότητες σε προκλινικές μελέτες.

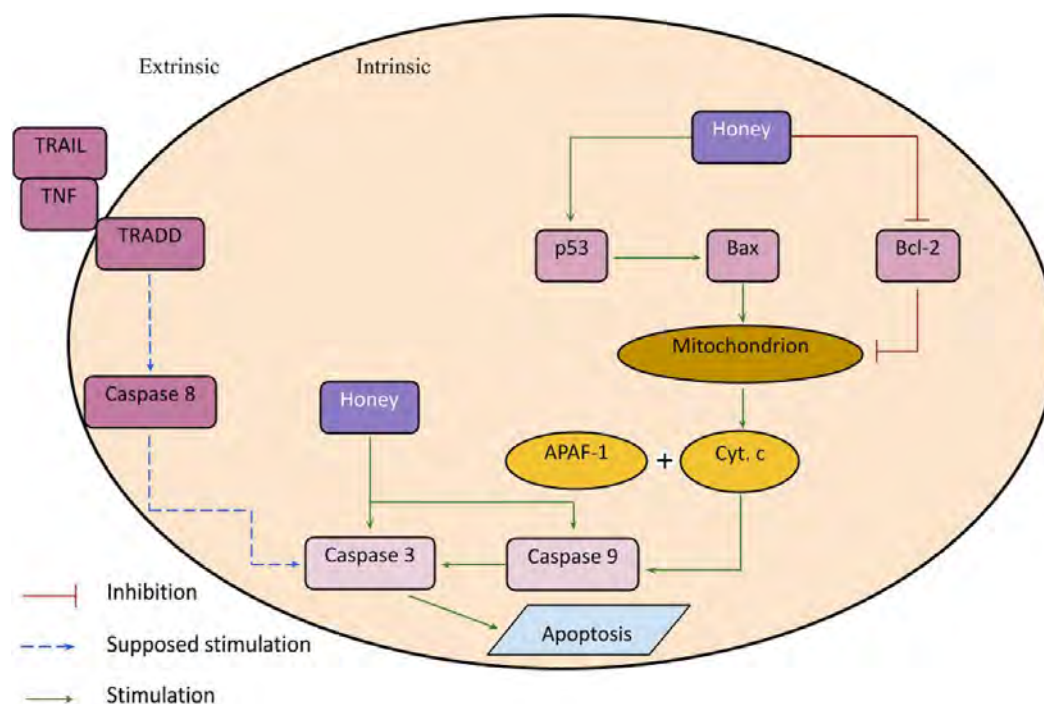
Οι δυννητικές αντικαρκινικές επιδράσεις του μελιού έχουν διερευνηθεί όσον αφορά την πρόληψη, την εξέλιξη και τη θεραπεία και αποδίδονται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η πρόκληση απόπτωσης, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, η βελτίωση της φλεγμονής, και η αναστολή της αγγειογένεσης.

Η απόπτωση είναι μια προγραμματισμένη κυτταρική διαδικασία που εξαλείφει τα κατεστραμμένα κύτταρα. Μέσω της θετικής ρύθμισης (up-regulation) ορισμένων προαποπτωτικών πρωτεϊνών και της αρνητικής ρύθμισης (down-regulation) άλλων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών το μέλι θεωρείται επαγωγέας της απόπτωσης (εικόνα 14).

Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός για την επίδραση του μελιού στα καρκινικά κύτταρα είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μέσω της τροποποίησης ορισμένων μορίων (π.χ. κυκλοοξυγενάση και ορισμένες κινάσες), με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενδομεμβρανικών πρωτεϊνών στο κυτταρόλυμα, με αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων. Οι επιδράσεις αυτές μπορεί να αποδίδονται σε συγκεκριμένες ενώσεις που βρίσκονται στο μέλι, όπως η χρυσίνη και ο φαινεθυλεστέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE), οι οποίες έχουν επιδείξει αντικαρκινικές ιδιότητες σε εργαστηριακές μελέτες.

Τέλος, μία από τις βασικές πτυχές της δυννητικής αντικαρκινικής δράσης του μελιού έγκειται στην αντιοξειδωτική του ικανότητα, καθώς είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και άλλες πολυφαινόλες, οι οποίες διαθέτουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Συνοψίζοντας, ενώ η αντικαρκινική δράση του μελιού είναι ένας πολλά υποσχόμενος τομέας έρευνας, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το μέλι δεν πρέπει να θεωρείται αυτόνομη θεραπεία για τον καρκίνο. (Zammit Young & Blundell, 2023)(Afrin et al., 2020)(Cianciosi et al., 2018).



Εικόνα 14. Η επίδραση του μελιού στο μονοπάτι της απόπτωσης (Zammit Young & Blundell, 2023).

#### ❖ Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει μελετηθεί εκτενώς και οι φυσικές ιδιότητες του το καθιστούν ισχυρό παράγοντα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, ακόμη και ορισμένων ιών. (Almasaudi, 2021).

Πρώτον, το μέλι έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (περίπου 17-20%), με αποτέλεσμα να τραβάει την υγρασία από τους μικροοργανισμούς μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ώσμωση, αφυδατώνοντάς τους.

Επιπροσθέτως, το μέλι είναι φυσικά όξινο, με pH που κυμαίνεται από περίπου 3,2 έως 4,5. Αυτή η οξύτητα δημιουργεί ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών, καθώς ορισμένα βακτήρια και μύκητες προτιμούν ουδέτερες ή αλκαλικές συνθήκες.

Επιπλέον, το μέλι περιέχει φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση. Οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν τις μεμβράνες των μικροβιακών κυττάρων, να παρεμβαίνουν στις μεταβολικές τους διαδικασίες και να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους (Mandal & Mandal, 2011).

Η μεθυλογλυοξάλη (MGO) καθώς και το αντιβακτηριδιακό πεπτίδιο ντεφενσίνη-1, έχουν ταυτοποιηθεί ως σημαντικοί παράγοντες της αντιβακτηριδιακής δραστηριότητας που ασκείται από ορισμένους τύπους μελιού.

Τέλος, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο μέλι συμβάλλει στην αντιμικροβιακή του δράση, καθώς συμβάλλει αποτελεσματικά στην εξουδετέρωση βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. (Johnston et al., 2018; Sartore et al., 2021).

Συμπερασματικά, η πολύπλευρη αντιμικροβιακή δράση του μελιού το καθιστά πολύτιμη ουσία για διάφορες εφαρμογές, όπως η φροντίδα τραυμάτων, οι αναπνευστικές λοιμώξεις και τα γαστρεντερικά προβλήματα. (Patton et al., 2006).

#### ❖ Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού αποδίδεται σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών, βιταμινών και ενζύμων.

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα, είναι άφθονες στο μέλι και συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική του δράση. Οι ενώσεις αυτές, όπως για παράδειγμα η κερκετίνη, η καμφερόλη και το καφεϊκό οξύ, είναι γνωστές για την ικανότητά τους να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες, εμποδίζοντάς τες να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες. Η παρουσία αυτών των ενώσεων προσδίδει στο μέλι το χαρακτηριστικό του χρώμα και συμβάλλει στη συνολική αντιοξειδωτική του ικανότητα.

Το μέλι περιέχει επίσης βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E.

Συνοπτικά, η αντιοξειδωτική δράση του μελιού είναι μια σύνθετη αλληλεπίδραση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων, οι οποίες συμβάλλουν συλλογικά στις πιθανές επιδράσεις του για την υγεία (Alvarez-Suarez et al., 2013).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος της επίδρασης του μελιού δάσους με μελιτώματα καθώς και δύο διαφορετικών ειδών ανθόμελου τόσο στην κυτταρική βιωσιμότητα όσο και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης της κυτταρικής σειράς μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7.

Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς σε διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού και στη συνέχεια διεξήχθη εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης μέσω φασματοφωτομετρίας (TAC, TBARS και protein carbonyls) και κυτταρομετρίας ροής (ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS).

## **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1 Δείγματα μελιού**

Τα δείγματα συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2020 στην ευρύτερη περιοχή των Ιωαννίνων, στην Πίνδο. Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά 3 πολυανθικά μέλια (2 ανθόμελα και 1 μέλι δάσους με μελιτώματα). Τα μέλια διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

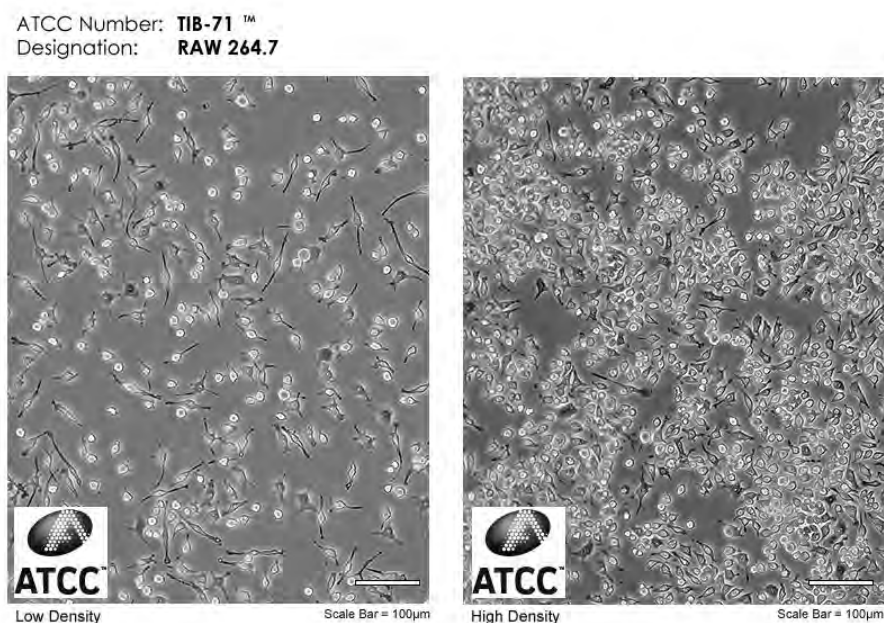
### **3.2 Προετοιμασία διαλυμάτων**

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκτίμηση της επίδρασης των διαφορετικών δειγμάτων μελιού στην βιωσιμότητα των κυττάρων και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης έγινε παρασκευή διαλυμάτων ορισμένης συγκέντρωσης από τα 3 διαφορετικά μέλια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ζύγιση των δειγμάτων μελιού σε ζυγό ακριβείας, έγινε διαλυτοποίηση αυτών με την προσθήκη απιονισμένου νερού (dH<sub>2</sub>O). Η ποσότητα του απιονισμένου νερού που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε με βάση τον νόμο της αραίωσης ( $C_1V_1 = C_2V_2$ ), ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση (συγκέντρωση stock 250 mg/ml) . Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε θέρμανση των διαλυμάτων σε θερμοκρασία 35-40 °C για 5 λεπτά προκειμένου να ομογενοποιηθεί το δείγμα.

### **3.3 Κυτταρική σειρά RAW264.7**

Τα RAW 264.7 είναι μια σειρά μακροφάγων κυττάρων η οποία δημιουργήθηκε από έναν όγκο ενός αρσενικού ποντίκιου που προκλήθηκε με τον ιό της λευχαιμίας του ποντικού Abelson (εικόνα 15) (ATCC). Είναι καλά χαρακτηρισμένη κυτταρική σειρά

όσον αφορά τις μεσολαβούμενες από τα μακροφάγα ανοσοποιητικές, μεταβολικές και φαγοκυτταρικές λειτουργίες (Hartley et al., 2008; Kong et al., 2019).



Εικόνα 15. Απεικόνιση καλλιέργειας RAW264.7 σε χαμηλή και υψηλή πυκνότητα (RAW 264.7 - TIB-71 | ATCC, n.d.).

### 3.4 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

Η καλλιέργεια των κυττάρων RAW 264.7 πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> κάτω σε ποσοστό CO<sub>2</sub> 5% και θερμοκρασία 37°C. Οι συνθήκες αυτές παρέμειναν σταθερές στον κλίβανο μέσα στον οποίο επωάζονταν τα κύτταρα, εωσότου το 70% - 80% της επιφάνειας της φλάσκας να καλύπτεται από κύτταρα. Το θρεπτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς ήταν το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της Gibco (4.5 g/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη), με 10% v/v εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη καθώς και 100 μονάδες/ml πενικιλίνη. Ο ορός αυτός διευκολύνει την προσκόλληση

των κυττάρων στην φλάσκα, παρέχοντας τόσο θρεπτικά συστατικά όσο και αυξητικούς παράγοντες με αποτέλεσμα να προάγεται η υγιής ανάπτυξη των κυττάρων.

Για την ανακαλλιέργεια των RAW 264.7, αφού έγινε απόρριψη του μέσου κυττροκαλλιέργειας και πλύση με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS), προστέθηκαν 5 ml DMEM με 10% FBS. Στην συνέχεια έγινε χρήση ξέστρου (scraper) προκειμένου τα κύτταρα να αποκολληθούν από την φλάσκα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μεταφορά του εναιωρήματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer και η υπολογίστηκε η ποσότητα που θα πρέπει να επιστρωθεί, η οποία και μεταφέρθηκε σε καινούργια φλάσκα, ώστε να υπάρχουν κατά προσέγγιση 2 εκατομμύρια κύτταρα/φλάσκα 75cm<sup>2</sup>(Patouna et al., 2023)

### 3.5 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των ειδών μελιού

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική αξιολογήθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου XTT. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή ενός άλατος τετραζολίου από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός υδατοδιαλυτού προϊόντος φορμαζάνης (εικόνα 16). Το προϊόν της φορμαζάνης δύναται να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450nm και χαρακτηρίζεται από ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα.



Εικόνα 16. Αναγωγή του XTT προς σχηματισμό προϊόντος φορμαζάνης.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η κυτταρική βιωσιμότητα εξετάστηκε με τη χρήση του κιτ δοκιμής XTT (R&D Systems, Inc.). Συνολικά 10.000 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κάθε κυψελίδα μιας πλάκας 96 κυψελίδων σε πλήρες θρεπτικό μέσο (DMEM + 10 % FBS) και επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και εκ νέου επώαση με ένα εύρος συγκεντρώσεων ακατέργαστου μελιού σε θρεπτικό μέσο (DMEM) απουσία βόειου ορού (FBS). Με το πέρας των 24 ωρών, προστέθηκαν 50 μl του διαλύματος XTT, που περιείχε 49 μl αντιδραστήριο σήμανσης XTT και 1 μl ενεργοποιητή XTT σε κάθε κυψελίδα της πλάκας. Έπειτα, ακολούθησε επώαση για 4 ώρες στους 37°C και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 450 και 630 nm (που είναι το μήκος κύματος αναφοράς) με τη χρήση αναγνώστη πλάκας (Bio-Tek ELx800; Bio-Tek instruments, inc.). Να σημειωθεί ότι μετρήθηκε η απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης από κάθε δείγμα μελιού χωρίς κύτταρα καθώς και η απορρόφηση των κυττάρων απουσία δείγματος μελιού (control), χρησιμοποιώντας τον ίδιο αναγνώστη πλακών.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Οι τιμές απορρόφησης που ελήφθησαν από κυψελίδες που περιείχαν μόνο δείγματα μελιού αφαιρέθηκαν από εκείνες που ελήφθησαν από κυψελίδες που περιείχαν την αντίστοιχη συγκέντρωση δείγματος μελιού μαζί με κύτταρα. Εν συνεχεία, έγινε χρήση των τιμών της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (control) και αυτών που επωάστηκαν με τις συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού προκειμένου να βρεθεί η μεταβολή της βιωσιμότητας των κυττάρων με την βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Κυτταρική βιωσιμότητα (\% μεταβολή από την ομάδα ελέγχου)} = \frac{\text{Οπτική απορρόφηση (Δείγματος)}}{\text{Οπτική απορρόφηση (Ομάδα ελέγχου)}} \times 100.$$

### 3.6 Αξιολόγηση της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρικές μεθόδους

Προκειμένου, να αξιολογηθεί η επίδραση των δειγμάτων μελιού στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων RAW 264.7, όσον αφορά τους δείκτες που καθορίστηκαν με χρήση φασματοφωτομετρίας, διενεργήθηκε καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκες καλλιέργειας επιφάνειας 75cm<sup>2</sup>.

Αναφορικά με τη μέτρηση των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης με χρήση φασματοφωτομετρίας, αφού αποκολλήθηκαν τα κύτταρα από την επιφάνεια των φλασκών, προστέθηκε κυτταρικό εναιώρημα συγκεκριμένης ποσότητας (4.000.000 κύτταρα/φλάσκα). Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο για 24 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί πληρότητα περίπου 70%-80%. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου, πραγματοποιήθηκε πλύση PBS και προσθήκη των δειγμάτων μελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έπειτα ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού μέσου χωρίς FBS και επώαση των κυττάρων για 24 ώρες.

Εν συνεχεία, μετά την απαιτούμενη επώαση, το θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και πραγματοποιήθηκε μία ακόμα πλύση με PBS, μετά την οποία ακολούθησε προσθήκη 0.5 ml PBS με αναστολείς πρωτεασών. Για να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ξέστρο και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε tubes των 1.5 ml. Έπειτα, τα tubes τοποθετήθηκαν σε πάγο με σκοπό την λύση των κυττάρων μέσω της διαδικασίας των υπερήχων. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει εφαρμογή υπερήχων ( πλάτος κύματος : 70% + παλμός : 0,7 δευτερόλεπτα) για 10 δευτερόλεπτα και παύση αντίστοιχου χρονικού διαστήματος ανάμεσα σε κάθε υπέρηχο. Τελευταίο βήμα αποτελεί η φυγοκέντρωση (4°C , 20 λεπτά, 15000g) με σκοπό την λήψη του υπερκείμενου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών μέσω φασματοφωτομετρίας.

### 3.6.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προκειμένου να επιτευχθεί η διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων, ήταν απαραίτητο να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης που περιέχεται στο κυτταρικό εναιώρημα. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο περιέχει τη χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue, η οποία, όταν αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός προϊόντος το οποίο απορροφά στα 595 nm και έχει μπλε χρώμα.

#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Αντιδραστήριο Bradford

Για την παρασκευή 1 L του αντιδραστηρίου Bradford, ζυγίστηκαν 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue και προστέθηκαν 50 ml αιθανόλης 95% (v/v) και φωσφορικού οξέος 85% (w/v). Τέλος, πραγματοποιείται ογκομέτρηση με προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι το 1L, ανάδευση και φιλτράρισμα.

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε tubes των 1,5ml προστίθενται διαδοχικά οι παρακάτω όγκοι :

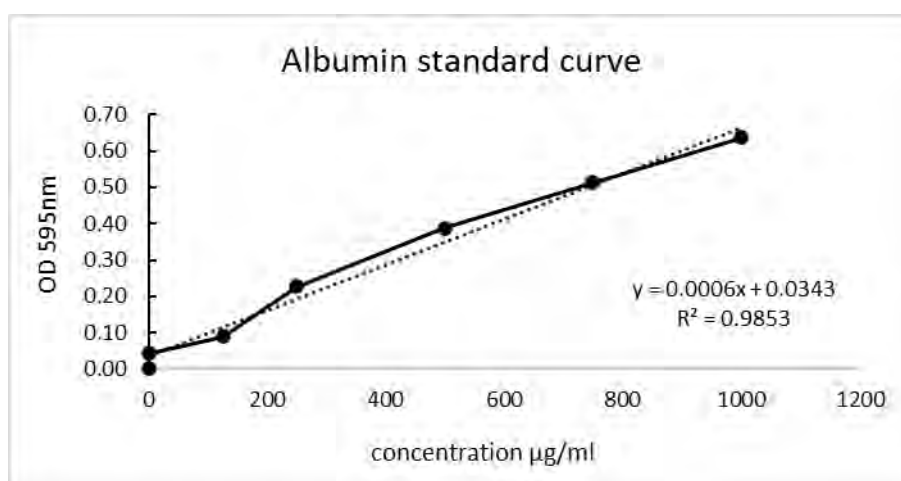
	Blank	Δείγμα
Κυτταρόλυμα (Αραίωση 1/10 σε PBS)	-	20 μl
PBS	20 μl	-
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml

Πίνακας 1. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Με το πέρας της επώασης, μετράται η απορρόφηση στα 595 nm.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της συνολικής πρωτεΐνης, σχεδιάστηκε πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού σε  $\mu\text{g/ml}$ . Προέκυψε εξίσωση της μορφής  $y=ax+b$  από την καμπύλη και συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης υπολογίστηκε με βάση τους συντελεστές  $a$  και  $b$ .



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

### **3.6.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με φασματοφωτομετρικές μεθόδους**

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων, η παραπάνω ρίζα ( $\text{DPPH}\cdot$ ) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε tubes των 1,5 ml προστίθενται οι όγκοι που φαίνονται παρακάτω :

	<b>Control</b>	<b>Δείγμα</b>
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM, pH = 7.4)</b>	500 μl	<b>500-x μl</b>
<b>Διάλυμα ρίζας DPPH<sup>•</sup> (0.1 mM)</b>	500 μl	<b>500 μl</b>
<b>Κυτταρόλυμα</b>	-	<b>X μl</b>

Πίνακας 2. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

Το x αποτελεί τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε περιεχόμενο συνολικής πρωτεΐνης ίσο με 40 μg όπως αυτό προέκυψε από την μέθοδο Bradford. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και επώαση για 60 λεπτά. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (3 λεπτά, 25°C, 15000g). Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε πλαστική κυψελίδα και μετράται η οπτική απορρόφηση στα 520 nm.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

$$\text{DPPH (mmol / ml)} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 50 * (1000 / X)] / 1000$$

- % Abs μείωση  $\rightarrow [(AbsControl - Abs\Delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) / AbsControl] * 100$
- η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα  $\rightarrow 50 \mu\text{mol} / \text{L}$  κυψελίδας.

### **3.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με φασματοφωτομετρικές μεθόδους**

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά

οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, σε falcon των 15ml προστίθενται x μl κυτταρολύματος (x ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει 80 μg συνολικής πρωτεΐνης) και 400-x μl PBS. Για το control προστίθενται 400 μl PBS. Εν συνεχεία, ακολουθεί προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7.4) και 500 μl TCA 35%, ανάδευση στο vortex και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκε 1 ml διαλύματος Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) – TBA (55 mM) και τα falcon τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 95°C για 45 λεπτά. Μετά την επώαση τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο για 5 λεπτά και προστίθεται 1 ml διαλύματος TCA 70%. Σε Tubes 1,5ml μεταφέρεται 1 ml από κάθε falcon και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11200 g στους 25 °C για 3 λεπτά. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 530 nm.

### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol} / \text{ml}) = [(\text{Abs}\text{Δείγματος} - \text{AbsControl}) / 0,156 * (3400 / X)] / 1000$$

- 0,156 → συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA

### 3.6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με φασματοφωτομετρικές μεθόδους

#### ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Είναι αξιόπιστης δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αν υποστούν πολύ βαριές βλάβες δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPΗ (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε tubes 1,5 ml προστέθηκαν x μl κυτταρολύματος (όπου x ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει τουλάχιστον 80 μg συνολικής πρωτεΐνης) και 400-x μl PBS. Έπειτα, προστέθηκαν 500 μl DNPΗ(14 mM) για τα δείγματα και 500 μl HCL(2.5N) για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό) τα οποία επώαστηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C, και το υπερκείμενο απομακρύνεται, ενώ στο ίζημα προστίθεται 1 ml TCA 10%. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθούν 2 βήματα πλύσης με 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v) με ενδιάμεση φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά την δεύτερη πλύση, στο ίζημα προστίθεται 1 ml ουρίας(5M, pH=2.3) και τα δείγματα μπαίνουν σε κλίβανο στους 37°C για επώαση, για 15 λεπτά. Τέλος, γίνεται μία τελευταία φυγοκέντρηση (15000g, 5 λεπτά, 4°C) και μετράται η οπτική απορρόφηση στα 375 nm.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol / ml) = [(Abs<sub>Δείγματος</sub> - Abs<sub>Tυφλού</sub>) / 0,022 \* (1000 / X)].

- 0,022 → μοριακός συντελεστής απόσβεσης του DNPH

### **3.7 Εκτίμηση της επίδρασης δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική, που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση και το χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε υγρό που ρέει. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων αλλά και των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ρέουν μέσω μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

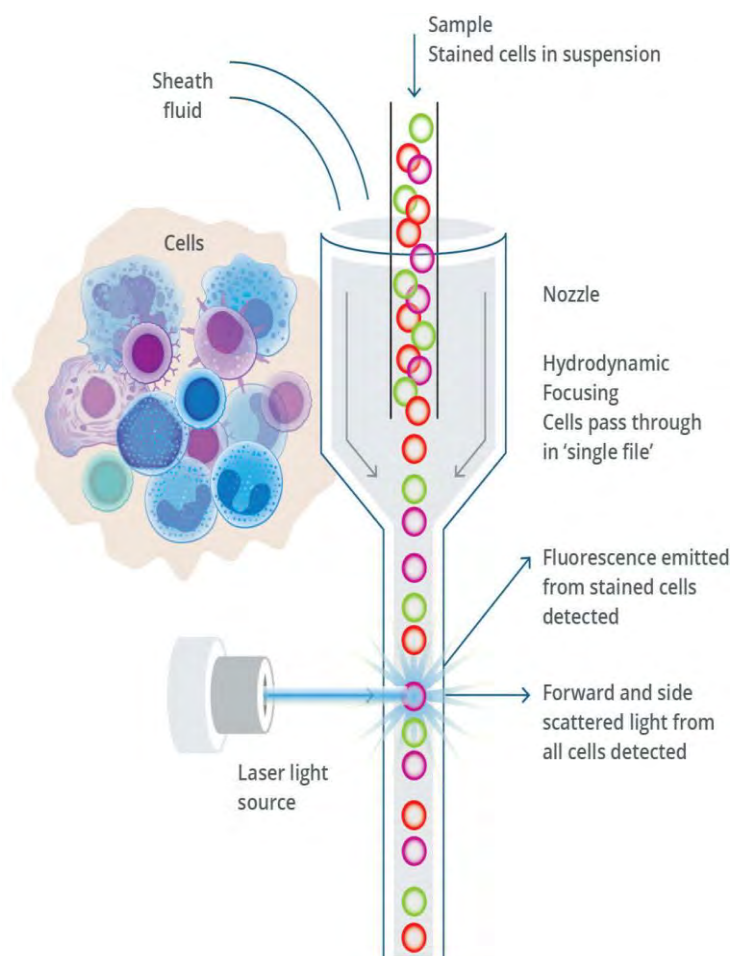
#### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Μία δέσμη φωτός ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Συγκεκριμένα, ένας βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι είναι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνεύουν φθορισμό. Ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός λαμβάνεται από τους ανιχνευτές και καθιστά δυνατή την αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).

## ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης χιλιάδων σωματιδίων κάθε δευτερόλεπτο σε "πραγματικό χρόνο. Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από 5 βασικά μέρη:

1. Διάλυμα κάλυψης (sheath fluid) που περιβάλλει το διάλυμα με τα κύτταρα και τα διευθετεί ώστε να περνούν ένα - ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
2. Ένα οπτικό σύστημα που παράγει φωτεινά σήματα
3. Έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού σε ηλεκτρικά σήματα
4. ένα σύστημα ενίσχυσης σήματος με δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
5. έναν Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων



Εικόνα 17. Κίνηση κυττάρων σε μονή σειρά ενώ αλληλεπιδρούν με την ακτίνα λέιζερ που συλλέγεται από ανιχνευτές (Principles of Flow Cytometry, n.d.).

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) καθώς και της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν είναι διοξική 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H<sub>2</sub>DCFDA) και Thiol Green Dye, αντίστοιχα για κάθε περίπτωση.

Η διοξική 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H<sub>2</sub>DCFDA), η οποία είναι από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ROS εσωτερικά του κυττάρου. Εισέρχεται μέσα στο κύτταρο μέσω διάχυσης και στην συνέχεια αποακετυλιώνεται και σχηματίζεται ένα προϊόν το οποίο λέγεται 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη(H<sub>2</sub>DCF). Το συγκεκριμένο προϊόν φθορίζεται και ανιχνεύεται η ύπαρξη του μετρώντας την ένταση του φθορισμού (μήκος κύματος εκπομπής στα 530 nm με μήκος κύματος διέγερσης στα 488nm).

Η Thiol Green είναι ένας ανιχνευτής θειολικών ενώσεων. Η ικανότητα αυτού του ανιχνευτή να αλληλοεπιδρά με θειολικές ενώσεις έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος το οποίο είναι φθορίζον και πράσινου χρώματος. Η ύπαρξη του επιβεβαιώνεται μετρώντας την ένταση του φθορισμού (μήκος κύματος εκπομπής στα 525 nm με μήκος κύματος διέγερσης στα 490nm).

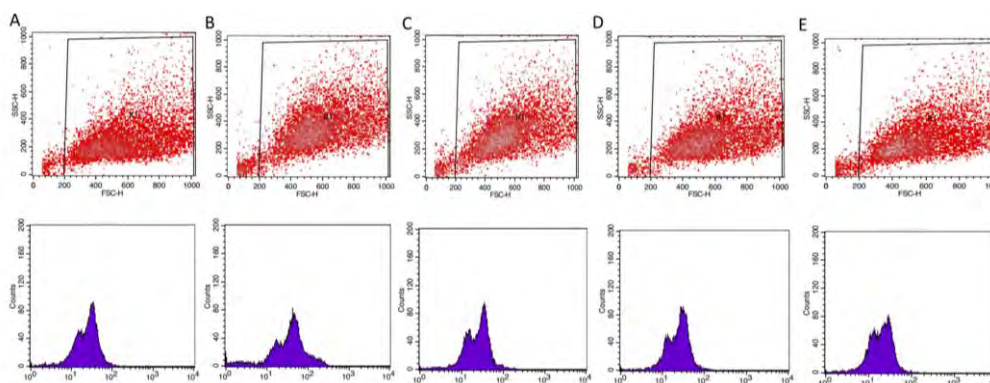
### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για τη μέτρηση τόσο των ROS, όσο και της GSH, τα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 κυψελίδων με πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο για 24 ώρες με 300.000 κύτταρα/κυψελίδα. Ακολούθως, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και τα κύτταρα επώάζονται για 8 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων μελιών, σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο χωρίς FBS. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έγινε πλύση με 1 ml PBS.

Για την μέτρηση των ROS, προστέθηκε 1,5 ml H<sub>2</sub>DCFDA / κυψελίδα και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά. Έπειτα, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε tubes 1,5 ml με την βοήθεια πιπέτας.

Για την μέτρηση της GSH, προστέθηκαν 250 μl θρυψίνης /κυψελίδα και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για 30 δευτερόλεπτα. Μετά την προσθήκη 1 ml θρεπτικού DMEM με FBS, έγινε επαναιώρηση και μεταφορά σε tubes των 1,5 ml, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (1500 g , 5 λεπτά , 4°C) , απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml PBS , διαλυτοποίηση και ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Αφού αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο, προστέθηκαν 1 ml PBS και 5 μl χρωστική ThioI Green / tube και, τέλος, τα δείγματα επωάστηκαν στον κλίβανο για 30 λεπτά με μία ενδιάμεση ανάδευση στα 15 λεπτά. Συνεχίζοντας και για τις δύο περιπτώσεις, ακολούθησε φυγοκέντρηση (1500 g , 5 λεπτά , 4°C), αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, έγινε προσθήκη 500 μl PBS και διαλυτοποίηση. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρονται σε σωληνάκια κυτταρομέτρου και τοποθετούνται στον πάγο μέχρι να ξεκινήσει ανάλυση με το κυτταρόμετρο.

Προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος και η εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο εμπρόσθιος και ο πλευρικός σκεδασμός του φωτός, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 10.000 κύτταρα / δείγμα, με ρυθμό ροής 1000 συμβάντα / δευτερόλεπτο ενώ η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αξιολογήθηκαν με τη χρήση του BD Cell Quest 6.0 (BD Biosciences).



Εικόνα 18. Παράδειγμα διαγράμματος διασποράς και ιστογράμματα όπως προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής. Τα διαγράμματα είναι αντιπροσωπευτικά ενός δείγματος μελιού (A) ομάδα ελέγχου, (B) 25 mg/ml, (C) 12,5 mg/ml, (D) 6,25 mg/ml και (E) 3,125 mg/ml

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

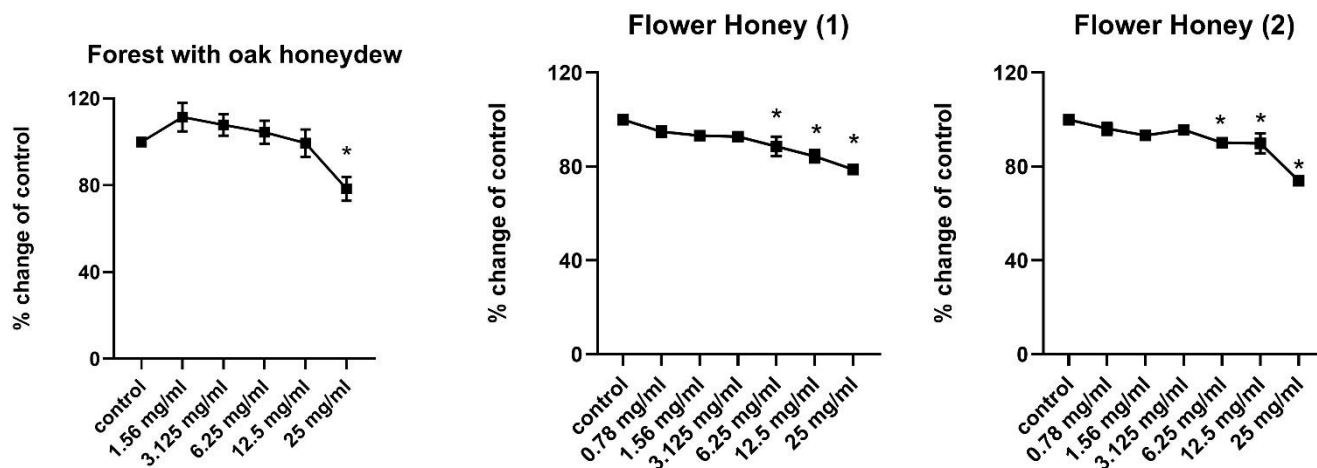
### 4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων διαφορετικών ειδών μελιού στην κυτταρική σειρά RAW264.7

Προκειμένου να γίνει εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων μελιών που μελετώνται στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XXT. Αναλυτικότερα η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με σκοπό να προσδιοριστούν και να αποκλειστούν από τις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες οι κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Μη επιλέξιμες είναι οι συγκεντρώσεις που σημειώσανε κυτταροτοξικότητα  $\leq 20\%$ .

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το μέλι δάσους με μελιτώματα δεν σημείωσε κάποια σημαντική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα στις συγκεντρώσεις 1,56 mg/ml, 3,125 mg/ml, 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml. Όμως παρατηρείται ότι η μείωση του πληθυσμού των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση 25 mg/ml συγκριτικά με τον πληθυσμό της ομάδας control είναι στατιστικώς σημαντική.

Σχετικά με το ανθόμελο 1 παρατηρείται ότι δεν προκαλείται στατιστικώς σημαντική μεταβολή της βιωσιμότητας των κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα control στην περίπτωση των συγκεντρώσεων 0,78 mg/ml, 1,56 mg/ml και 3,125 mg/ml. Όμως από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας που παρατηρείται για τις συγκεντρώσεις 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml και 25 mg/ml συγκριτικά με τα επίπεδα του πληθυσμού των κυττάρων της ομάδας control είναι στατιστικώς σημαντική. Τέλος, όσον αφορά το ανθόμελο 2 από τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικώς σημαντική μεταβολή του κυτταρικού πληθυσμού όταν έγινε χορήγηση των συγκεντρώσεων 0,78 mg/ml, 1,56 mg/ml και 3,125 mg/ml. Αντιθέτως, στην περίπτωση των πιο υψηλών συγκεντρώσεων 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml και 25 mg/ml παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας συγκριτικά με την ομάδα control.

Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω στο διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2. Η επίδραση όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων, όλων των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού (μέλι δάσους με μελιτώματα, ανθόμελο 1, ανθόμελο 2) στην κυτταρική βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς RAW 264.7.

\* : Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2 Προσδιορισμός των επιδράσεων δειγμάτων διαφορετικών ειδών μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW264.7

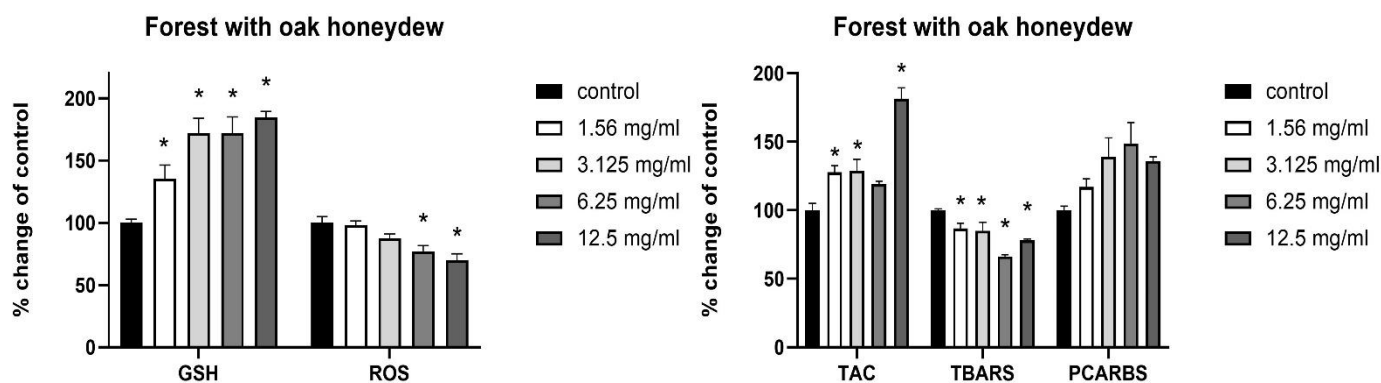
Μετά την εκτίμηση της κυτταροτοξικής επίδρασης που είχε κάθε δείγμα μελιού στα RAW 264.7 σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, έπειτα από επώαση για 24 ώρες, το επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος των επιδράσεων τους σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, κάτω από ίδιες συνθήκες επώασης. Αναλυτικότερα, εκτιμήθηκαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της TAC, της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) καθώς και τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα επίπεδα των συγκεκριμένων δεικτών υποδηλώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μελιού. Επιπροσθέτως, εξετάστηκαν ακόμη και τα επίπεδα των βιοδεικτών TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες είναι αντιπροσωπευτικοί της οξειδωτικής βλάβης σε επίπεδο λιπιδίων και πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

##### 4.2.1 Μέλι δάσους με μελιτώματα

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο XTT, όσον αφορά το μέλι δάσους με μελιτώματα χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη οι συγκεντρώσεις

1,56 mg/ml, 3,125 mg/ml, 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml. Η συγκέντρωση 25 mg/ml εξαιτίας της υψηλής κυτταροτοξικής δράσης που εμφάνισε στην κυτταρική σειρά RAW264.7 δεν εξετάστηκε στο επόμενο κομμάτι της μελέτης.

Αρχικά, ξεκινώντας από τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control και στις τέσσερις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Συνεχίζοντας, όσον αφορά τα επίπεδα των ROS, σημειώνεται στις δύο πιο υψηλές συγκεντρώσεις, δηλαδή την 6,25 mg/ml και την 12,5 mg/ml, μια στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα control. Προχωρώντας στα επίπεδα της TAC, φαίνεται να υπάρχει στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control στις συγκεντρώσεις 1,56 mg/ml, 3,125 mg/ml και 12,5 mg/ml. Επίσης, η συγκέντρωση 6,25 mg/ml φαίνεται να παρουσιάζει τάση αύξησης των επιπέδων της TAC συγκριτικά με την ομάδα control, χωρίς όμως αυτή η αύξηση να είναι στατιστικώς σημαντική. Όλες οι συγκεντρώσεις, με βάση τα αποτελέσματα, μειώνουν τα επίπεδα των TBARS συγκριτικά με την ομάδα control, με την μείωση αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική. Εδώ να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση 6,25 mg/ml παρατηρείται ότι προκαλεί μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των TBARS. Τέλος, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δεν επηρεάστηκαν αφού δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.

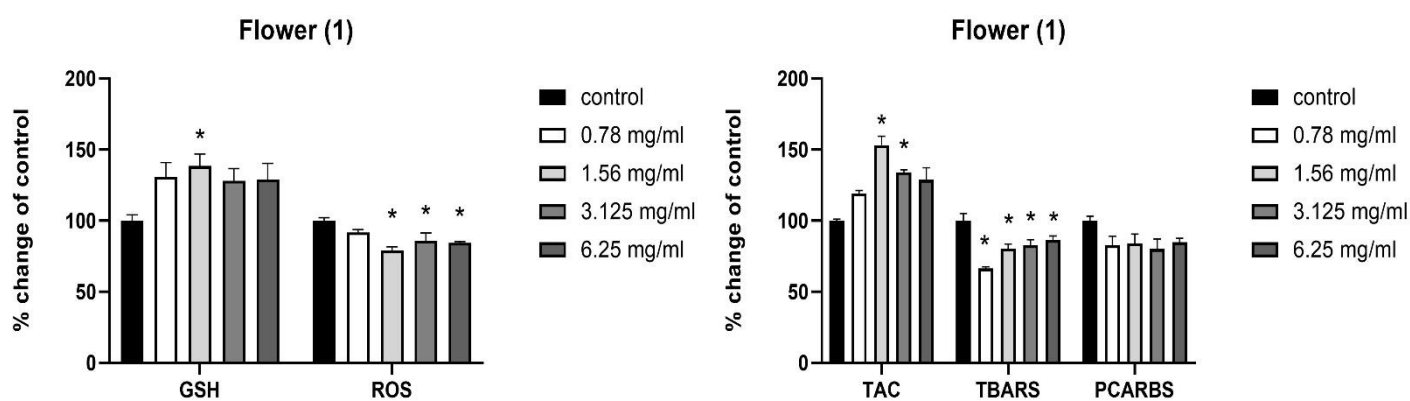


Διάγραμμα 3. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού δάσους με μελιτώματα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7. \*: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ( $p < 0.05$ )

## 4.2.2. Ανθόμελο 1

Στην περίπτωση του συγκεκριμένου μελιού, μελετήθηκε η επίδραση του στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στις συγκεντρώσεις 0,78 mg/ml, 1,56 mg/ml, 3.125 mg/ml και 6,25 mg/ml.

Όσον αφορά την GSH, παρατηρείται τάση για αύξηση των επιπέδων της σε όλες τις συγκεντρώσεις συγκριτικά με την ομάδα control. Όμως μόνο στην συγκέντρωση 1,56 mg/ml η αύξηση που παρατηρείται είναι στατιστικώς σημαντική. Σχετικά με τα επίπεδα των ROS, οι τρεις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων τους συγκριτικά με την ομάδα control. Στα επίπεδα της TAC σημειώνεται στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control στις συγκεντρώσεις 1,56 mg/ml και 3,125 mg/ml, ενώ τα επίπεδα των TBARS σε όλες τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control. Τέλος, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δεν επηρεάστηκαν αφού δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.

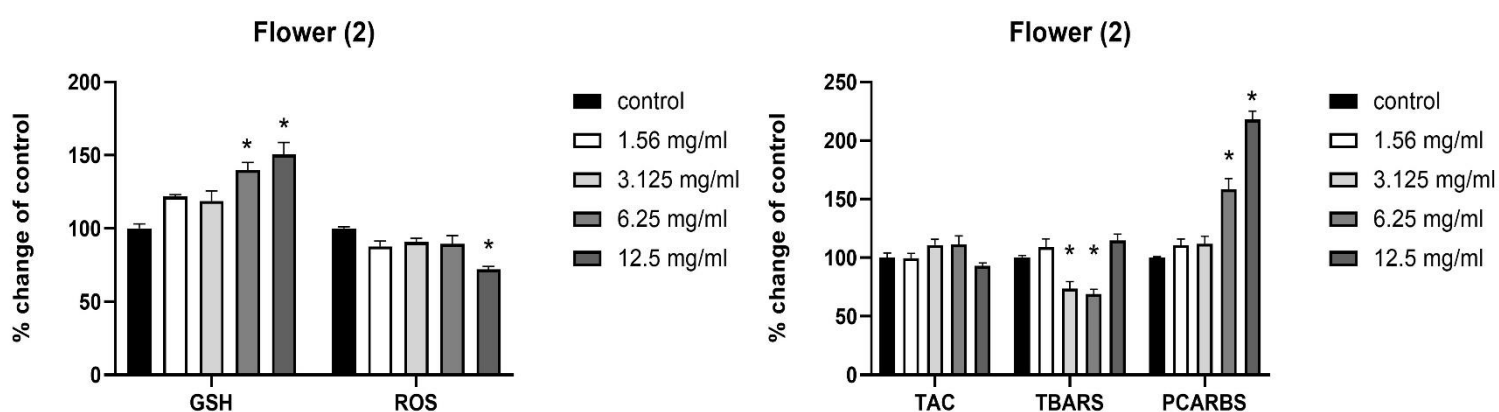


Διάγραμμα 4. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του ανθόμελου 1 σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7. \*: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ( $p < 0.05$ )

### 4.2.3. Ανθόμελο 2

Για την μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου μελιού στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT, ήταν οι 1,56 mg/ml, 3.125 mg/ml, 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml.

Αρχικά, παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml είναι οι μόνες που έχουν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH συγκριτικά με την ομάδα control. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι σε όλες τις συγκεντρώσεις παρατηρείται τάση για αύξηση των επιπέδων της GSH. Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS σημειώνεται στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα control μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση, δηλαδή την 12,5 mg/ml. Σχετικά με τα επίπεδα της TAC δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε καμία από τις συγκεντρώσεις. Όμως, αναφορικά με τα επίπεδα των TBARS, παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα control, στις δύο ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, την 3,125 mg/ml και την 6,25 mg/ml. Τέλος, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control, στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες είναι η 6,25 mg/ml και η 12,5 mg/ml. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται κάτωθι στο διάγραμμα 5.



Διάγραμμα 5. Η επίδραση των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του ανθόμελου 2 σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην κυτταρική σειρά RAW 264.7.

\*: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ( $p < 0.05$ )

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την αρχαιότητα, τα μελισσοκομικά προϊόντα όπως το μέλι, η πρόπολη, η γύρη, ο βασιλικός πολτός και το κερί συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων φυσικών προϊόντων λόγω των ισχυρών θεραπευτικών ιδιοτήτων τους και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε βιοδραστικά μόρια (Kuropatnicki et al., 2018; Martinello & Mutinelli, 2021).

Σήμερα, η διατροφή και ο ισορροπημένος τρόπος ζωής αναγνωρίζεται ευρέως ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών. Για να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής τους, οι σύγχρονοι καταναλωτές αναζητούν και χρησιμοποιούν όλο και περισσότερο τρόφιμα πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες φυσικής προέλευσης (Almasaudi, 2021; Cianciosi et al., 2018).

Το μέλι είναι ένα σύνθετο μείγμα, το οποίο αποτελείται από μία ποικιλία περίπου 180 ενώσεων, όπως υδατάνθρακες (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη), φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες, ένζυμα, ελεύθερα αμινοξέα και βιταμίνες. Τα οφέλη του μελιού για την υγεία δύναται να αποδοθούν σε συστατικά που έχουν αποδεδειγμένα ευεργετική δράση, όπως είναι τα φλαβονοειδή και οι φαινόλες, με τα πιο άφθονα από αυτά να είναι η χρυσίνη, η καεμφερόλη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, το γαλλικό οξύ κ.λπ. Η πλειονότητα της αντιοξειδωτικής δράσης του μελιού καθορίζεται από τις χημικές ενώσεις του, οι οποίες περιλαμβάνουν καρροτενοειδή, φαινόλες, φλαβονοειδή, ένζυμα, οργανικά οξέα, και αμινοξέα (Al-Kafaween et al., 2023; Da Silva et al., 2016; Nguyen et al., 2019).

Οι χημικές ουσίες που είναι γνωστές ως φυτοχημικές βρίσκονται στα φυτά. Οι μέλισσες μπορούν να τρέφονται με φυτά πλούσια σε φυτοχημικές ουσίες, γεγονός που τους επιτρέπει να μεταφέρουν τα ευεργετικά συστατικά στο μέλι. Η συγκέντρωση των υδατανθράκων και άλλων δευτερευουσών χημικών ουσιών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τη βοτανική τους πηγή, τις τεχνικές επεξεργασίας, τις εποχικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και άλλες μεταβλητές. Ορισμένα συστατικά του μελιού συνεισφέρουν οι μέλισσες, ενώ άλλα είναι αποτέλεσμα βιολογικών αντιδράσεων που συμβαίνουν καθώς το μέλι ωριμάζει (Da Silva et al., 2016; Heleno et al., 2015).

Επιστημονικές μελέτες αποδίδουν στα προϊόντα της μέλισσας ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία, όπως αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιυικές ιδιότητες και πολλές άλλες. Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες είναι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία συμβάλλει στην πρόληψη ορισμένων ασθενειών, προστατεύοντας τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες, όπως οι ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης του μελιού και των προϊόντων του στο κύτταρο, δεν είναι ακόμη γνωστοί (Ahmed et al., 2018; Bogdanov et al., 2008; Gheldof et al., 2003; Meo et al., 2017; Patton et al., 2006).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της επίδρασης ενός δείγματος μελιού δάσους με μελιτώματα και δύο ειδών ανθόμελου, όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα αλλά και τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού RAW264.7.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των τριών δειγμάτων μελιού που αφορούν τη συγκεκριμένη μελέτη, στην βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς RAW264.7, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φάνηκε ότι και τα τρία δείγματα μελιού εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση, στην υψηλότερη συγκέντρωση από αυτές που επιλέχθηκαν, δηλαδή την 25mg/ml. Επιπροσθέτως, και τα δύο είδη ανθόμελου, είχαν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, όταν χορηγήθηκαν στις συγκεντρώσεις 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml, ενώ όταν το μέλι δάσους με μελιτώματα χορηγήθηκε στις ίδιες συγκεντρώσεις δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση. Συμπερασματικά, τα μέλια άνθεων 1 και 2 εμφάνισαν μεγαλύτερη κυτταροτοξική επίδραση στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (RAW264.7) συγκριτικά με το μέλι δάσους με μελιτώματα.

Όσον αφορά την επιλογή συγκεντρώσεων για κάθε δείγμα μελιού, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτη, αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT. Για το μέλι δάσους με μελιτώματα επιλέχθηκαν οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,56 mg/ml – 12,5 mg/ml , καθώς η συγκέντρωση 25 mg/ml αποκλείστηκε λόγω της σημαντικής επίδρασης στην μείωση του κυτταρικού πληθυσμού. Επίσης , η συγκέντρωση 25 mg/ml δεν χρησιμοποιήθηκε ούτε για τα δύο μέλια άνθεων, καθώς και στις δύο περιπτώσεις εμφάνισε μεγάλη κυτταροτοξικότητα. Αναλυτικότερα, για το μέλι άνθεων 1 οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν οι 0,78

mg/ml, 1,56 mg/ml, 3,125 mg/ml, και 6,25 mg/ml. Η συγκέντρωση 6,25mg/ml, αν και είχε ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, μπορεί να χαρακτηριστεί οριακά κυτταροτοξική καθώς κατά την χορήγηση της σημειώθηκε αναστολή της βιωσιμότητας λιγότερο από 20%. Για τον λόγο αυτό, συμπεριλήφθηκε στα πειράματα που ακολούθησαν. Τέλος, σχετικά με το μέλι ανθέων 2, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για χρήση στα επόμενα πειράματα είναι οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1,56 mg/ml – 12,5 mg/ml. Ο λόγος που επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 6,25 mg/ml και 12,5 mg/ml παρά το ότι εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση, ήταν ότι είχαν το ίδιο αποτέλεσμα όσον αφορά την αναστολή βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού, οπότε θεωρήθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης.

Προχωρώντας, μελετήθηκε η επίδραση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων για κάθε δείγμα μελιού, σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Μετά από επώαση 24 ωρών, έλαβε χώρα μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS και GSH μέσω κυτταρομετρίας ροής. Επίσης, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της επίδρασης των δειγμάτων στα επίπεδα της TAC καθώς και στις συγκεντρώσεις εντός του κυττάρου, των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Αρχικά, όσον αφορά το μέλι δάσους με μελιτώματα, παρατηρήθηκαν μεταβολές τόσο στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS, της GSH και της TAC, όσο και στα επίπεδα της συγκέντρωσης των TBARS. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δεν επηρεάστηκαν καθώς στα αποτελέσματα δεν υπήρχε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα control. Αναλυτικότερα, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της GSH συγκριτικά με την ομάδα control σε όλες τις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν, ενώ μόνο οι δύο πιο υψηλές συγκεντρώσεις (6,25mg/ml και 12,5mg/ml) είχαν στατιστικώς σημαντική επίδραση στα επίπεδα των ROS, όπου παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων συγκριτικά με την ομάδα control. Επίσης, όλες οι συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν με εξαίρεση την 6,25mg/ml, είχαν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της TAC συγκριτικά με την ομάδα control. Η συγκέντρωση 6,25mg/ml αν και δεν είχε κάποιο στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα, και αυτή εμφάνισε τάση αύξησης των επιπέδων της TAC. Είναι γνωστό ότι σχηματισμός των TBARS και η μέτρηση τους αποτελεί μία μέθοδο για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Οπότε φαίνεται ότι όλες οι συγκεντρώσεις, ακόμη και η πιο χαμηλή, ήταν αποτελεσματικές όσον αφορά

την αντιμετώπιση μορίων που προκαλούν οξειδωτική βλάβη, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των TBARS συγκριτικά με την ομάδα control, στο σύνολο των συγκεντρώσεων που χορηγήθηκαν. Συμπερασματικά, βλέπουμε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (12,5mg/ml), ήταν αυτή που είχε την μεγαλύτερη επίδραση, καθώς ήταν η μόνη που εμφάνισε αποτελέσματα στατιστικώς σημαντικά σε όλους τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που εξετάστηκαν.

Συνεχίζοντας, το δεύτερο δείγμα υπό μελέτη, δηλαδή το μέλι ανθέων 1, φάνηκε να έχει μικρότερη επίδραση στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης συγκριτικά με το μέλι δάσους με μελιτώματα. Αναλυτικότερα, αν και σε όλες τις συγκεντρώσεις παρατηρείται τάση για αύξηση των επιπέδων της GSH, μόνο η χορήγηση της 1,56mg/ml προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση. Επίσης, όλες οι συγκεντρώσεις, εκτός της 0,78mg/ml έχουν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων των ROS συγκριτικά με την ομάδα control. Σε αυτήν την περίπτωση, η στατιστικώς σημαντική μείωση των ROS συνδυαστικά με την παρατηρούμενη τάση αύξησης της GSH, πιθανόν αντικατοπτρίζουν την επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Ωστόσο, επειδή παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS, συγκριτικά με την ομάδα control, πιθανόν να μην ήταν δυνατή η προστασία των λιπιδίων από τη διαδικασία της υπεροξειδωσης.

Επιπλέον, το τρίτο δείγμα το οποίο είναι το μέλι ανθέων 2 εμφάνισε παρόμοια επίδραση όσον αφορά τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με το μέλι ανθέων 1, με εξαίρεση τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Το μέλι ανθέων 2 είναι το μοναδικό από τα τρία δείγματα, στο οποίο παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά καρβονύλια κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Πιο συγκεκριμένα, στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 6,25 mg/ml και 12,5mg/ml, προκαλείται στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων των καρβονυλίων συγκριτικά με την ομάδα control. Επίσης οι δύο αυτές συγκεντρώσεις, είναι οι μόνες που έχουν ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική αύξηση της GSH. Ενδιαφέρον έχει το ότι ενώ η χορήγηση της συγκέντρωσης 12,5 mg/ml προκαλεί στατιστικώς σημαντική αύξηση της GSH και μείωση των ROS, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Πιθανόν, αν και ενεργοποιήθηκαν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του

κυττάρου δεν κατάφεραν σε να προστατεύσουν τις πρωτεΐνες από την καρβονυλίωση αλλά και από τον κυτταρικό θάνατο όπως φάνηκε στη μέθοδο ΧΤΤ.

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η εμφάνιση ενός ορμητικού φαινομένου, στα επίπεδα των TBARS τόσο στο μέλι δάσους με μελιτώματα όσο και στο μέλι ανθέων 2. Αναλυτικότερα, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης στη χαμηλότερη συγκέντρωση, τα οποία ακολουθούνται από επαναφορά των TBARS σε φυσιολογικά επίπεδα και εν συνεχεία με χορήγηση της υψηλότερης συγκέντρωσης προκαλείται πάλι αύξηση. Έχει αποδειχθεί, ότι μετριασμένα επίπεδα δραστικών μορφών προκαλούν την προσαρμογή του κυττάρου σε καταστάσεις στρες. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως όρμηση και αποτελεί ένα βιολογικό φαινόμενο το οποίο περιγράφει την ικανότητα των οργανισμών να προσαρμόζονται σε περιπτώσεις που εκτίθενται σε έναν στρεσογόνο παράγοντα σε χαμηλά επίπεδα (Calabrese et al., 2010; Jalal et al., 2021).

Επιπροσθέτως, από τα αποτελέσματα του συνόλου των μεθόδων, φαίνεται το μέλι δάσους με μελιτώματα να έχει με θετικό τρόπο μεγαλύτερη επίδραση στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης και άρα αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα δύο μέλια ανθέων. Το μέλι δάσους με μελιτώματα χαρακτηρίζεται από σκούρο χρώμα και έχει διαφορετική σύνθεση, λόγω εκκρίσεων που προέρχονται από τα φυτά και τα έντομα. Γενικά, μελέτες έχουν συνδέσει το σκούρο χρώμα του μελιού με υψηλότερη ποσότητα σε φαινολικές ενώσεις συγκριτικά με τα μέλια ανθέων. Η αντιοξειδωτική ικανότητα έχει συσχετιστεί σε μεγάλο βαθμό με την παρουσία φαινολικών ενώσεων (Özcan & Ölmez, 2014; Starowicz et al., 2021). Ορισμένες φαινολικές ενώσεις, όπως η μυρικετίνη και η πινομπανκσίνη ανιχνεύονται μόνο σε μέλια μελιτώματος (Seraglio et al., 2019). Επιπλέον, σε *in vitro* cell-free δοκιμές στα ίδια δείγματα μελιού, που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών προκειμένου να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, φάνηκε ότι το μέλι δάσους με μελιτώματα επιδεικνύει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αναλυτικότερα, με βάση τα αποτελέσματα, σε όλες τις *in vitro* cell free δοκιμές έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μέλια ανθέων ενώ διαθέτει και μεγαλύτερο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (Patouna et al., 2023).

Συγκρίνοντας τα δύο μέλια ανθέων μεταξύ τους, παρατηρείται ότι και τα δύο στις ίδιες συγκεντρώσεις (1,56 mg/ml, 3,125mg/ml, 6,25 mg/ml) εμφανίζουν μία τάση αύξησης των επιπέδων της GSH και μία μικρή τάση μείωσης των ROS. Δηλαδή όπως φαίνεται, και τα δύο δείγματα μπορούν δυνητικά να ενεργοποιήσουν την αντιοξειδωτική άμυνα. Ωστόσο, το μέλι ανθέων 1 σε δύο συγκεντρώσεις, έχει ως αποτέλεσμα την στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της TAC και γενικότερα παρουσιάζεται μία τάση αύξησης της TAC σε όλες τις συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με το μέλι ανθέων 2 όπου μετά την χορήγηση των συγκεντρώσεων τα επίπεδα της TAC παραμένουν κοντά σε αυτά της ομάδας control. Επίσης, παρατηρείται διαφορά όσον αφορά τα επίπεδα των TBARS, καθώς η χορήγηση μελιού ανθέων 1 συγκέντρωσης 6,25mg/ml επιφέρει στατιστικώς σημαντικής αύξηση των TBARS συγκριτικά με την ομάδα control, ενώ χορήγηση μελιού ανθέων 2 ίδιας συγκέντρωσης προκαλεί στατιστικώς σημαντική μείωση των TBARS. Οι παρατηρούμενες διαφορές, μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως η τοποθεσία, οι κλιματικές συνθήκες, η σύσταση του τα οποία επηρεάζουν την ανθική προέλευση. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το παραγόμενο μέλι με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στη χημική σύσταση κάθε μελιού. Επίσης, είναι πιθανό μέλια με την ίδια ανθική προέλευση, τα οποία παράγονται σε διαφορετικές περιοχές να έχουν διαφορετική χημική σύσταση και ιδιότητες (Kaškonienė & Venskutonis, 2010). Επιπροσθέτως, εκτός από την ανθική πηγή και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τόσο οι τεχνικές παραγωγής όσο και οι συνθήκες αποθήκευσης που χρησιμοποιούν οι μελισσοκόμοι, επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση του εκάστοτε μελιού (Soares et al., 2017).

Εν κατακλείδι, τόσο το μέλι δάσους με μελιτώματα, όσο και τα μέλια ανθέων, προκάλεσαν αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων GSH, με παράλληλη μείωση των επιπέδων των ROS, χωρίς ωστόσο οι μεταβολές αυτές να είναι απαραίτητα αναλογικές της συγκέντρωσης. Επίσης παρατηρήθηκε μία μεμονωμένη στατιστικώς σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μελιού ανθέων 1. Τέλος, σε όλα τα δείγματα μελιού τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας αυξάνονται ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και η συγκέντρωση των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης μειώνεται ή παραμένει κοντά στην ομάδα control. Γενικά, υπάρχουν κάποιοι μηχανισμοί οι οποίοι θεωρούνται ως πιθανοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του μελιού, όπως είναι η εξουδετέρωση ριζών, η λειτουργία ως δότες υδρογόνου και η χρήση φλαβονοειδών ως υποστρώματα για τις

δράσεις των ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου(Ahmed et al., 2018). Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητες περαιτέρω έρευνες με τη χρήση κυτταρικών σειρών, προκειμένου να αποκτηθούν πληροφορίες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα, το μεταβολισμό και την πρόσληψη των αντιοξειδωτικών συστατικών του μελιού.

- Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(7), 822. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070822>
- Nam, T. (2011). Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicological Research*, 27(1), 1–6. <https://doi.org/10.5487/TR.2011.27.1.001>
- Nascimento, K. S. do, Gasparotto Sattler, J. A., Lauer Macedo, L. F., Serna González, C. V., Pereira de Melo, I. L., da Silva Araújo, E., Granato, D., Sattler, A., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian Apis mellifera honeys. *LWT*, 91, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.016>
- Nguyen, H. T. L., Panyoyai, N., Kasapis, S., Pang, E., & Mantri, N. (2019). Honey and Its Role in Relieving Multiple Facets of Atherosclerosis. *Nutrients*, 11(1), 167. <https://doi.org/10.3390/nu11010167>
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3), 159–165. <https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>
- Ortiz-Vázquez, E., Ruiz Ruiz, J., Magaña-Ortíz, D., & Ramón Sierra, J. (2016). Stingless Bee's Honey from Yucatán: Culture, Traditional Uses and Nutraceutical Potential. In *Stingless Bee's Honey from Yucatan: Culture, Traditional Uses and Nutraceutical Potential*.
- Özcan, M. M., & Ölmez, Ç. (2014). Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, 163, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.072>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Markers of Oxidative Stress in Erythrocytes and Plasma During Aging in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(1), 2–12. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10476>
- Patouna, A., Vardakas, P., Skaperda, Z., Spandidos, D., & Kouretas, D. (2023). Evaluation of the antioxidant potency of Greek honey from the Taygetos and Pindos mountains using a combination of cellular and molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 27(2), 54. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.12941>
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., & Moran, N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.007>
- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afrin, S., Haneefa, S. M., Fernandez-Cabezudo, M. J., Giampieri, F., al-Ramadi, B. K., & Battino, M. (2020). Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: An evidence-based review. *Nutrition Research Reviews*, 33(1), 50–76. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000192>
- Aguilar, T. A. F., HernándezNavarro, B. C., Pérez, J. A. M., Aguilar, T. A. F., HernándezNavarro, B. C., & Pérez, J. A. M. (2016). Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In *A Master Regulator of Oxidative Stress—The Transcription Factor Nrf2*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65715>
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. (2020). New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382. <https://doi.org/10.3390/ijms21020382>
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 8367846. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Al-Kafaween, M. A., Alwahsh, M., Mohd Hilmi, A. B., & Abulebdah, D. H. (2023). Physicochemical Characteristics and Bioactive Compounds of Different Types of Honey and Their Biological and Therapeutic Properties: A Comprehensive Review. *Antibiotics*, 12(2), 337. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020337>
- Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2188–2196. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621–638. <https://doi.org/10.2174/092986713804999358>
- Aurongzeb, M., & Azim, K. (2011). *Antimicrobial properties of natural honey: A review of literature*. 44, 118–124.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bae, Y. S., Oh, H., Rhee, S. G., & Yoo, Y. D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and Cells*, 32(6), 491–509. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0276-3>
- Barzilai, A., & Yamamoto, K.-I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 3(8–9), 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3527579. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>

- Becerril-Sánchez, A. L., Quintero-Salazar, B., Dublán-García, O., & Escalona-Buendía, H. B. (2021). Phenolic Compounds in Honey and Their Relationship with Antioxidant Activity, Botanical Origin, and Color. *Antioxidants*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/antiox10111700>
- Bentabol Manzanares, A., Hernández García, Z., Rodríguez Galdón, B., Rodríguez-Rodríguez, E. M., & Díaz Romero, C. (2017). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of monofloral honeys from Tenerife, Spain. *Food Chemistry*, *228*, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.150>
- Bertoncelj, J., Golob, T., Kropf, U., & Korošec, M. (2011). Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*, 1661–1671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02664.x>
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, *27*(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, *35*. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>
- Bonsignore, G., Patrone, M., Martinotti, S., & Ranzato, E. (2021). “Green” Biomaterials: The Promising Role of Honey. *Journal of Functional Biomaterials*, *12*(4), 72. <https://doi.org/10.3390/jfb12040072>
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T., Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2010). Cellular Stress Responses, The Hormesis Paradigm, and Vitagenes: Novel Targets for Therapeutic Intervention in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(11), 1763–1811. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3074>
- chahra, makhloufi, Taïbi, K., & Ait Abderrahim, L. (2020). Characterization of Invertase and Diastase Activities, 5-Hydroxymethylfurfural Content and Hydrogen Peroxide Production of Some Algerian Honeys. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *44*. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-00936-x>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboledo-Rodríguez, P., Manna, P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P., Quiles, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, *23*(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, *196*, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, *6*, 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
- De-Melo, A., Almeida-Muradian, L., Sancho, M., & Pascual Maté, A. (2017). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, *57*, 1–33. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>

- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00826-2)
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: Why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
- El-Seedi, H. R., Eid, N., Abd El-Wahed, A. A., Rateb, M. E., Afifi, H. S., Algethami, A. F., Zhao, C., Al Naggar, Y., Alsharif, S. M., Tahir, H. E., Xu, B., Wang, K., & Khalifa, S. A. M. (2021). Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties. *Frontiers in Nutrition*, 8, 761267. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.761267>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Gheldof, N., Wang, X.-H., & Engeseth, N. J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1500–1505. <https://doi.org/10.1021/jf025897t>
- Griffiths, H. R., Dias, I. H. K., Willetts, R. S., & Devitt, A. (2014). Redox regulation of protein damage in plasma. *Redox Biology*, 2, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.010>
- Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.011>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th edition). Oxford University Press.
- Hartley, J. W., Evans, L. H., Green, K. Y., Naghashfar, Z., Macias, A. R., Zervas, P. M., & Ward, J. M. (2008). Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-1>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hoover, S. E., & Ovinge, L. P. (2018). Pollen Collection, Honey Production, and Pollination Services: Managing Honey Bees in an Agricultural Setting. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1509–1516. <https://doi.org/10.1093/jee/toy125>
- Israili, Z. H. (2014). Antimicrobial properties of honey. *American Journal of Therapeutics*, 21(4), 304–323. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318293b09b>

- Jalal, A., Oliveira Junior, J. C. de, Ribeiro, J. S., Fernandes, G. C., Mariano, G. G., Trindade, V. D. R., & Reis, A. R. D. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111225>
- Jamshidi-kia, F., Wibowo, J. P., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhasanzadeh, Z., & Lorigooini, Z. (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 9(3), 191–199. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.25>
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), 22–28. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_862\\_16](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16)
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655–664. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>
- Jonathan Chessum, K., Chen, T., Hamid, N., & Kam, R. (2022). A comprehensive chemical analysis of New Zealand honeydew honey. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 157, 111436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111436>
- Kaczmarek, A. M., Muzolf-Panek, M., Tomaszewska-Gras, J., & Konieczny, P. (2019). Predicting the Botanical Origin of Honeys with Chemometric Analysis According to Their Antioxidant and Physicochemical Properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(2), 191–201. <https://doi.org/10.31883/pjfn/108526>
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(1), 86–102. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746>
- Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620–634. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x>
- Kaurinovic, B., Vastag, D., Kaurinovic, B., & Vastag, D. (2019). Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. In *Antioxidants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83731>
- Kawser Hossain, M., Abdal Dayem, A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Kumar Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H. Y., & Cho, S.-G. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 569. <https://doi.org/10.3390/ijms17040569>
- Khan, F. R., Abadin, Z. Ul., & Rauf, N. (2007). Honey: Nutritional and medicinal value: Honey: nutritional and medicinal value. *International Journal of Clinical Practice*, 61(10), 1705–1707. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01417.x>
- Kong, L., Smith, W., & Hao, D. (2019). Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3077–3087. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14277>

- Kouka, P., Tekos, F., Valta, K., Mavros, P., Veskoukis, A. S., Angelis, A., Skaltsounis, A.-L., & Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncology Reports*, *42*(6), 2814–2825. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7386>
- Kritsky, G., & Kritsky, G. (2015). *The Tears of Re: Beekeeping in Ancient Egypt*. Oxford University Press.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, *24*, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Kuropatnicki, A. K., Klósek, M., & Kucharzewski, M. (2018). Honey as medicine: Historical perspectives. *Journal of Apicultural Research*, *57*(1), 113–118. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411182>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(3), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lorenzon Dos Santos, J., Quadros, A. S. de, Weschenfelder, C., Garofallo, S. B., & Marcadenti, A. (2020). Oxidative Stress Biomarkers, Nut-Related Antioxidants, and Cardiovascular Disease. *Nutrients*, *12*(3), 682. <https://doi.org/10.3390/nu12030682>
- Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A. C. (2020). Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin—A Review on their Occurrence on Monofloral Honeys. *Molecules*, *25*(2), 374. <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *1*(2), 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(1), 71. <https://doi.org/10.3390/antiox10010071>
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., & Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(5), 975–978. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Moghadam, Z. M., Henneke, P., & Kolter, J. (2021). From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.628991>
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., Emran, T. B., & Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer,

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Ramsay, E. I., Rao, S., Madathil, L., Hegde, S. K., Baliga-Rao, M. P., George, T., & Baliga, M. S. (2019). Honey in oral health and care: A mini review. *Journal of Oral Biosciences*, *61*(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.job.2018.12.003>
- Salvi, A., Carrupt, P., Tillement, J., & Testa, B. (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: Assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*, *61*(10), 1237–1242. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00607-4)
- Sartore, S., Boyd, S., Slabaugh, D., Jain, N., Piepenbrink, B., Blount, S., Alla, Z., Cheso, W., Belanger, H., Arnold, T. P., Sartore, S., Boyd, S., Slabaugh, D., Jain, N. H., Piepenbrink, B. E., Blount, S., Alla, Z., Cheso, W., Belanger, H., & Arnold, T. P. (2021). Honey and Its Antimicrobial Properties: A Function of a Single Component, or the Sum of Its Parts? *Cureus*, *13*(9). <https://doi.org/10.7759/cureus.17718>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology : CB*, *24*(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schievano, E., Finotello, C., Uddin, J., Mammi, S., & Piana, L. (2016). Objective Definition of Monofloral and Polyfloral Honey based on NMR Metabolomic Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(18), 3645–3652. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00619>
- Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Brugnerotto, P., Silva, B., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Quality, composition and health-protective properties of citrus honey: A review. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *143*, 110268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110268>
- Seraglio, S. K. T., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International*, *119*, 44–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028>
- Sergiel, I., Pohl, P., & Biesaga, M. (2014). Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *145*, 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.068>
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, *11*, 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Simova, S., Atanassov, A., Shishiniova, M., & Bankova, V. (2012). A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, *134*(3), 1706–1710. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.071>

- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, *71*, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Soares, S., Pinto, D., Rodrigues, F., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2017). Portuguese Honeys from Different Geographical and Botanical Origins: A 4-Year Stability Study Regarding Quality Parameters and Antioxidant Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(8), 1338. <https://doi.org/10.3390/molecules22081338>
- Starowicz, M., Ostaszyk, A., & Zieliński, H. (2021). The Relationship between the Browning Index, Total Phenolics, Color, and Antioxidant Activity of Polish-Originated Honey Samples. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(5), 967. <https://doi.org/10.3390/foods10050967>
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Sugamura, K., & Keane, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *51*(5), 978–992. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>
- Tashkandi, H. (2021). Honey in wound healing: An updated review. *Open Life Sciences*, *16*(1), 1091–1100. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0084>
- Teleanu, D. M., Niculescu, A.-G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladăncu, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *98*, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A., & Kouretas, D. (2020). Approaching reactive species in the frame of their clinical significance: A toxicological appraisal. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *138*, 111206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111206>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones*, *17*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>
- Villalpando-Aguilar, J. L., Quej-Chi, V. H., López-Rosas, I., Cetzal-Ix, W., Aquino-Luna, V. Á., Alatorre-Cobos, F., & Martínez-Puc, J. F. (2022). Pollen Types Reveal Floral Diversity in Natural Honeys from Campeche, Mexico. *Diversity*, *14*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/d14090740>

Viteri, R., Zacconi, F., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Bioactive compounds in *Apis mellifera* monofloral honeys. *Journal of Food Science*, *86*(5), 1552–1582.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15706>

Wang, J., & Li, Q. X. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 62, pp. 89–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00003-X>

Zammit Young, G.-W., & Blundell, R. (2023). A review on the phytochemical composition and health applications of honey. *Heliyon*, *9*(2), e12507.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12507>

Zamudio-Cuevas, Y., Martínez-Flores, K., Martínez-Nava, G. A., Clavijo-Cornejo, D., Fernández-Torres, J., & Sánchez-Sánchez, R. (2022). Rheumatoid Arthritis and Oxidative Stress. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, *68*(6), 174–184.

<https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.6.28>

Zawawi, N., Chong, P. J., Mohd Tom, N. N., Saiful Anuar, N. S., Mohammad, S. M., Ismail, N., & Jusoh, A. Z. (2021). Establishing Relationship between Vitamins, Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities in Various Honey Types. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(15), 4399. <https://doi.org/10.3390/molecules26154399>

Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *44*(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>