

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πατούνα Αναστασία

**«Μελέτη του αντιοξειδωτικού προφίλ γηγενών
ποικιλιών μελιού και της επίδρασης γέλης
μελιού στην οξειδοαναγωγική κατάσταση
ανθρώπων»**



ΛΑΡΙΣΑ, 2025

«Μελέτη του αντιοξειδωτικού προφίλ γηγενών ποικιλιών μελιού και της επίδρασης γέλης μελιού στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ανθρώπων»

«Evaluation of native honey varieties antioxidant profile and the effect of honey-based gel on humans' redox status»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριστείδης Βεσκούκης: Επίκουρος Καθηγητής Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περσεφόνη Γιαννούλη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Πουλάς: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Σέρκο Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι είναι ένα σύνθετο μείγμα, 180 περίπου συστατικών που διαθέτει ισχυρές βιολογικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων και η αντιοξειδωτική. Αξίζει να αναφερθεί ότι η βοτανική προέλευση του νέктar (το οποίο η μέλισσα χρησιμοποιεί για την παρασκευή του μελιού) αποτελεί κρίσιμη παράμετρο που καθορίζει τόσο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όσο και την σύστασή του. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν μελέτες που επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική δράση του μελιού ο μηχανισμός δράσης του δεν έχει αποσαφηνιστεί. Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διερεύνηση της βιολογικής δράσης μελιών που παράγονται στην Ελλάδα καθώς και η ικανότητα του μελιού να διατηρεί αυτές τις ιδιότητες του όταν χρησιμοποιηθεί ως βασικό συστατικό για την δημιουργία άλλου εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος.

Από την *in vitro* αξιολόγηση των μελιών προέκυψε ισχυρή βιολογική δράση λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου του, αλλά και της ισχυρής δράσης του έναντι στην ρίζα του υδροξυλίου. Στο επόμενο επίπεδο αναλύσεων χορηγήθηκαν μέλια σε 3 κυτταρικές σειρές (HepG2, MKN45 και RAW264.7), όπου αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να μεταβάλλουν δείκτες που σχετίζονται με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα μέλια είναι ικανά να διαταράζουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και να επάγουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Υπήρξε διαφορετική απόκριση ανά δείγμα και κυτταρική σειρά, χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρος σε αυτό το επίπεδο αναλύσεων ο μηχανισμός δράσης τους. Στα πλαίσια της Διατριβής εκτελέστηκε *in vivo* πείραμα σε υγιή άτομα αφού κατανάλωσαν ένα εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα με βασικό συστατικό το μέλι (γέλη μελιού). Η κατανάλωση της γέλης μελιού οδήγησε στην μείωση των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης αλλά και στην βελτίωση των εξεταζόμενων δεικτών που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση. Ένα αποτέλεσμα το οποίο είναι πιο εμφανές στις γυναίκες.

Εν κατακλείδι, από την Διατριβή επιβεβαιώθηκε ο πολλά υποσχόμενος ρόλο του μελιού στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Τον ισχυρισμό αυτό επιβεβαιώνει τόσο το *in vitro* αλλά κυρίως το *in vivo* πείραμα της μελέτης από το οποίο προέκυψαν θετικές μεταβολές στους δείκτες που εξετάστηκαν. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μελιού καθώς πρόκειται για ένα πολύ σύνθετο μίγμα με υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των

ειδών του. Η Διατριβή αποδεικνύει την σημαντικότητα της πολύπλευρης αξιολόγησης των επιδράσεων των φυσικών προϊόντων στην οξειδοαναγωγική υγεία, αφού η μελέτη τους μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών για την άμβλυνση του οξειδωτικού στρες.

Λέξεις κλειδιά

μέλι, οξειδωτικό στρες, οξειδοαναγωγική κατάσταση, κυτταρικές σειρές, βιοδραστικότητα, πιλοτική κλινική μελέτη

ABSTRACT

Honey is a complex mixture of approximately 180 components with powerful biological properties, including antioxidant. It is worth noting that the botanical origin of nectar (which bees used to make honey) is a critical parameter determining both its organoleptic characteristics and its composition. Although there are studies confirming the antioxidant activity of honey, its mechanism of action has not been clarified. The aim of the Thesis was to investigate the biological activity of honey produced in Greece and its ability to retain these properties when used as the main ingredient of a new commercially available product.

In vitro honeys evaluation revealed its strong biological activity due to their polyphenolic content, as well as their strong activity against hydroxyl radicals. The next level of analysis, which included honeys cell-based evaluation, honey samples were administered to three cell lines (HepG2, MKN45, and RAW264.7), where it was evaluated for its ability to alter biomarkers related to redox reactions. The results showed that honeys can disrupt redox homeostasis and inducing antioxidant mechanisms. There was a different response per sample and cell line, but their mechanism of action was not clear at this level of analysis. As part of the thesis, an *in vivo* experiment was conducted on healthy individuals after they consumed a commercially available product with honey as its main ingredient (honey gel). Consumption of the honey gel led to a reduction in blood pressure levels and an improvement in the biomarkers examined related to the redox state; a result that was more evident in women.

In conclusion, Thesis confirmed the promising role of honey in redox homeostasis. This claim is confirmed both by the *in vitro* and, more importantly, the *in vivo* experiments of the study, which showed positive changes in the biomarkers examined. Despite the positive results, further studies are needed to understand the mechanism of action of honey, as it is a very complex mixture with high variability between species. Thesis demonstrates the importance of a multifaceted assessment of the effects of natural products on redox health, as their study can lead to the development of strategies for mitigating oxidative stress.

Key words

honey, oxidative stress, redox status, cell line, bioactivity, pilot study

ΠΑΤΟΥΝΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

«Μελέτη του αντιοξειδωτικού προφίλ γηγενών ποικιλιών
μελιού, και της επίδρασης γέλης μελιού στην οξειδοαναγωγική
κατάσταση ανθρώπων»

«Evaluation of native honey varieties antioxidant profile, and
the effect of honey-based gel on humans' redox status»

Διδακτορική διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 22

Συνολικός αριθμός σελίδων: 182

Συνολικός αριθμός εικόνων: 45

Συνολικός αριθμός πινάκων: 19

Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 29

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 410

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2021-2025 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημήτριου Κουρέτα. Η Διατριβή χρηματοδοτήθηκε από πρόγραμμα σε συνεργασία με τη Περιφέρεια Ηπείρου με τίτλο «Ανάδειξη της ευεργετικής δράσης του μελιού της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου (Γράμμος, περιοχές Ζαγορίου, Μετσόβου, Περιστερίου και Τζουμέρκων) καθώς και της ευεργετικής δράσης του ενεργειακού τζέλ «Bear Strength» στην υγεία του ανθρώπου με κλινική μελέτη» και από ιδίους πόρους του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.

Οι καταναλωτές τα τελευταία χρόνια στρέφονται σε έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε υψηλή ζήτηση προϊόντα διατροφής υψηλής θρεπτικής αξίας, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και το μέλι. Το μέγεθος της παγκόσμιας αγοράς μελιού αποτιμήθηκε σε 9,01 δισεκατομμύρια δολάρια το 2022 και αναμένεται να αυξηθεί με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 5,3% από το 2023 έως το 2030. Μεταξύ των μεγαλύτερων παραγωγών στον κόσμο βρίσκεται η ΕΕ, με πρώτη την Κίνα. Εντός ΕΕ η Ελλάδα είναι εκ των κορυφαίων καλύπτοντας το 10% περίπου της συνολικής παραγωγής ενώ κατέχει και την πρώτη θέση στην ΕΕ αναλογίας κυψελών ανά μελισσοκόμο με 99. Ένα επίσης ενδιαφέρον στατιστικό είναι η κατανάλωση μελιού στη χώρα μας, που είναι επίσης ιδιαίτερα υψηλή αφού η ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση μελιού ανέρχεται στα 2,46 κιλά, με τον μέσο όρο στον υπόλοιπο κόσμο να είναι στα 0,23 κιλά.

Λόγω των κλιματολογικών συνθηκών αλλά και της μεγάλης βιοποικιλότητας που χαρακτηρίζει την Ελλάδα, οι μελισσοκόμοι ασχολούνται με την νομαδική μελισσοκομία, παράγοντας μέλια υψηλής ποιότητας. Παρά την μεγάλη σημαντικότητα που έχει το ελληνικό μέλι για την οικονομία, κοινωνία και διατροφή της χώρας είναι ένα προϊόν που δεν έχει μελετηθεί εις βάθος ως προς τις ιδιότητές του, γεγονός που έγκειται κυρίως στην σύνθετη σύστασή του.

Σε αυτό το πλαίσιο στην παρούσα Διατριβή αξιολογήθηκε η βιολογική δράση ελληνικών μελιών της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου *in vitro*, σε κυτταρικά και μη συστήματα ως προς την ικανότητά τους να επηρεάσουν δείκτες που σχετίζονται με

αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Παράλληλα αξιολογήθηκε μια γέλη μελιού *in vitro* σε μη κυτταρικά συστήματα αλλά και η επίδραση της σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης υγιών ατόμων. Η διεκπεραίωση του πειραματικού σχεδιασμού, η αξιολόγηση και δημοσίευση των αποτελεσμάτων μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση των ιδιοτήτων του ελληνικού μελιού καθώς και στην αύξηση της προστιθέμενης αξίας, προς όφελος της οικονομίας.

Ερωτήματα μελέτης:

1. Παρουσιάζουν τα ελληνικά μέλια βιοδραστικότητα;
2. Τα ελληνικά μέλια παρουσιάζουν διαφορές αναλογικές του είδους τους;
3. Ποια είναι η επίδραση των ελληνικών μελιών σε δείκτες οξειδοαναγωγής σε επίπεδο κυττάρου;
4. Η βιοδραστικότητα του μελιού διατηρείται και όταν χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία προϊόντος με βάση το μέλι;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή:

1. Patouna A, Vardakas P, Skaperda Z, Spandidos DA and Kouretas D: Evaluation of the antioxidant potency of Greek honey from the Taygetos and Pindos mountains using a combination of cellular and molecular methods. *Mol Med Rep* 27: 54, 2023
2. Patouna A, Sevdalis P, Papanikolaou K, Kourti M, Skaperda Z, Jamurtas AZ and Kouretas D: Evaluation of the effects of a honey-based gel on blood redox biomarkers and the physiological profile of healthy adults: A pilot study. *Biomed Rep* 18: 32, 2023
3. Patouna, A.; Tekos, F.; Charouli, M.; Vardakas, P.; Kouretas, D. Greek Raw Honey from Pindos Mountain Improves Redox Homeostasis of RAW264.7 Macrophages. *Int.J.Mol. Sci.* **2025**, *26*, 2868.
<https://doi.org/10.3390/ijms26072868>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτρη που με ενέταξε στην επιστημονική του ομάδα δίνοντάς μου την ευκαιρία να εκπονήσω την διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Θα μπορούσα να γράψω σελίδες επί σελίδων για την κοινή μας πορεία που μετράει σχεδόν 20 χρόνια, θα τα συνοψίσω όλα όμως σε ένα τεράστιο ευχαριστώ που μου φέρθηκε σαν πατέρα και μου έμαθε να μην είμαι στάσιμη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Βεσκούκη Αριστείδη για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια με την εμπειρία και την γνώση του αφού ήταν εκεί για να απαντήσει σε οποιαδήποτε απορία μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου κ. Στάγκο Δημήτριο για την συμβολή του καθ' όλη την πορεία μου στο εργαστήριο και την συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον ευχαριστώ την Αναληρώτρια Καθηγήτρια κ. Περσεφόνη Γιαννούλη, τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Λεωνίδα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Πουλά και τον Καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν που δέχθηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα Διδακτορική Διατριβή συμμετέχοντας στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένας καθοριστικός παράγοντας στην προσωπική μου ζωή αλλά και στην πορεία μου στο εργαστήριο είναι η ομάδα μας, η μικρή εργαστηριακή μου οικογένεια. Παρασκευή - Μαρία Νεχαλιώτη σε ευχαριστώ που έκανες την ζωή μου ευκολότερη ακόμη και όταν ασχολούμασταν με το recovery group. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω και στον Φώτη Τέκο για την στήριξη του καθ' όλη την πορεία μου στο εργαστήριο. Περικλή Βαρδάκα, Μαρία Γκασδρόγκα, Θωμά Καραμπατζάκη, Μαρία Κούρτη, Σωτηρία Μακρή, Ζωή - Βασιλική Σκαπέρδα, και Θάνο Τσιώρα σας ευχαριστώ για την βοήθεια και συμβολή σας στην προσπάθεια μου και για όλα αυτά τα χρόνια που έχουμε περάσει παρές.

Φίλη μου Αναστασία Καλαπούτη (Υποψήφια Διδάκτωρ του ΕΚΠΑ και Μελισσοκόμος) σε ευχαριστώ που με μύησες στον υπέροχο κόσμο της μελισσοκομίας και έλυσες όλες μου τις απορίες.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια μου. Στους γονείς μου Θανάση και Ευαγγελία και τα αδέρφια μου Βαγγέλη, Ηλία και Έλενα για την απεριόριστη και ουσιαστική στήριξη σε όλα τα μήκη και πλάτη της ζωής μου. Είναι η οικογένεια που εύχομαι όλοι να μπορούσαν να έχουν.

Μου πήρε μήνες να γυρεύω την ακτή μου,
και χαράμισα για αυτήν κάθε λεπτό και κάθε σκέψη μου.
Δεν ξέρω αν τελείωσε η αναζήτησή μου,
μα κατάλαβα καλά πως η ακτή μου είναι μέσα μου.

Νίκος Κίτσος

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	17
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	24
1.1.2 Παραγωγή Ελευθέρων ριζών.....	28
1.1.2.1 Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών	28
Οξειδωτική φωσφορυλίωση	28
Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (ΧΟ)	29
Ανοσοποιητικό σύστημα – Αντιμετώπιση φλεγμονής	29
Ένζυμα του κυτοχρώματος p450	30
1.1.1.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	30
.....	31
1.1.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών.....	31
1.2 Οξειδωτικό στρες.....	34
1.2.1 Προσαρμογές του κυττάρου για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες	36
1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	41
1.3.2 Κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών	42
1.4 Αντιοξειδωτικό παράδοξο	50
1.5 Το μέλι	51
1.5.1 Η ιστορία της μελισσοκομίας	51
1.5.2 Η μέλισσα και η συμπεριφορά στην κοινωνία της.....	52
1.5.3 Προϊόντα της κυψέλης	58
1.5.3 Σύσταση μελιού	64
1.5.4 Η επίδραση του μελιού στην υγεία.....	66
1.5.5 Κατηγοριοποίηση μελιών.....	67
1.5.6 Επικοινωνία.....	69
1.5.7 Οικονομικά στοιχεία.....	70
2. Σκοπός.....	73
3. In vitro cell-free ανάλυση των μελιών.....	75
3.1 Υλικά και μέθοδοι της in vitro cell-free ανάλυσης	76

3.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu	77
3.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH* ..	80
3.1.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ..	81
3.1.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα υδροξυλίου OH*	83
3.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O2* ⁻	86
3.1.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας μέσω της μεθόδου Reducing Power	87
3.1.7 Επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO*) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	89
3.1.8 Στατιστική ανάλυση.....	93
3.2 Αποτελέσματα	93
3.2.1 Αποτελέσματα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Folin Ciocalteu	93
3.2.2 Αποτελέσματα ως προς την ικανότητα των δειγμάτων μελιού να ανάγουν την ρίζα DPPH	95
3.2.3 Αποτελέσματα ως προς την ικανότητα των δειγμάτων μελιού να ανάγουν την ρίζα ABTS.....	96
3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης των δειγμάτων μελιού με τη ρίζα υδροξυλίου (OH*)	98
3.2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης τους με τη ρίζα O2* ⁻	99
3.2.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των προς μελέτη δειγμάτων (Reducing Power)	100
3.2.7 Έλεγχος προστασίας από επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO*) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	101
3.3 Συζήτηση.....	103
4. In vitro cell-based ανάλυση των μελιών	109
4.1 Υλικά και μέθοδοι της in vitro cell-based ανάλυσης	109
4.1.1 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων μελιού με τη μέθοδο ΧΤΤ	112
4.1.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων GSH και ROS με την χρήση κυτταρομετρίας ροής	113
4.1.3 Προσδιορισμός της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.....	116
4.1.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford.....	117
4.1.5 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	118
4.1.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θιοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	119

4.1.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	120
4.1.8 Στατιστική ανάλυση.....	121
4.2 Αποτελέσματα.....	122
4.2.1 Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας (ΧΤΤ)	122
4.2.2 Αποτελέσματα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης ανά δείγμα μελιού	122
4.3 Συζήτηση.....	129
5. Μελέτη επίδρασης της γέλης μελιού σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε υγιείς ανθρώπους	135
5.1 Υλικά και μέθοδοι.....	135
5.1.1 Φυσιολογικές μετρήσεις	137
5.1.2 Γενική εξέταση και διαχωρισμός Αίματος.....	137
5.1.3 Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin – Hb) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	138
5.1.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	138
5.1.5 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	139
5.1.6 Μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT)	140
5.1.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)	141
5.1.8 Προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS)	142
5.1.9 Στατιστική ανάλυση.....	143
5.2 Αποτελέσματα	143
5.3 Συζήτηση.....	148
6. Συμπεράσματα - Συζήτηση	152

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Απεικόνιση ενός σταθερού μορίου (αριστερά) και μιας ελεύθερης ρίζας (δεξιά) κύτταρο ^{1,2} .	24
Εικόνα 2. Παραγωγή ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση ¹⁴ .	28
Εικόνα 3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης ²² .	29
Εικόνα 4. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών ⁴ .	31
Εικόνα 5. Μετατροπή των λιπιδίων σε ρίζα ⁴⁷ .	33
Εικόνα 6. Επίδραση των ελευθέρων ριζών στα μακρομόρια ³⁶ .	34
Εικόνα 7. Οξειδωτικό στρες ⁵² .	35
Εικόνα 8. Η σχέση του οξειδωτικού στρες με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση ⁶⁰⁻⁶³ .	36
Εικόνα 9. Ο Nrf2 σε συνθήκη ομοιόστασης (αριστερά) και σε συνθήκη οξειδωτικού στρες (δεξιά) ⁶⁷ .	37
Εικόνα 10. Ορμετική ζώνη ^{73,74} .	38
Εικόνα 11. Τα στάδια της αυτοφαγίας ^{83,84} .	40
Εικόνα 12. Τα στάδια της απόπτωσης ⁸⁶ .	41
Εικόνα 13. Γενικό σχήμα που απεικονίζει τους 5 κύριους μηχανισμούς με τους οποίους λειτουργεί ένα αντιοξειδωτικό ⁹¹ .	42
Εικόνα 14. Απεικόνιση της δράσης των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ^{46,48,93} .	44
Εικόνα 15. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός γλουταθειόνης ⁹⁹ .	45
Εικόνα 16. Αντίδραση (a) Haber-Weiss και (b) Fenton ^{117,118} .	46
Εικόνα 17. Κατηγοριοποίηση πολυφαινόλων ¹¹⁹ .	47
Εικόνα 18. Ρεσβερατρόλη ^{121,122} .	48
Εικόνα 19. Στεγανασίνη	48
Εικόνα 20. Πινορεσινόλη	48
Εικόνα 21. Πώρινη αναστομή κυψέλη κινητής κηρήθρας από τα Κύθηρα.	51
Εικόνα 22. <i>Apis mellifera</i> . Κατηγοριοποίηση ανά φύλο και κάστα	54
Εικόνα 23. Βιολογικός κύκλος εργάτριας μέλισσας ⁴⁰² .	55
Εικόνα 24. Εργάτρια μέλισσα που έχει συλλέξει γύρη και την έχει αποθηκεύσει προσωρινά στο καλάθι γύρης.	58
Εικόνα 25. Κηρογόνοι αδένες <i>A. Mellifera</i> .	61
Εικόνα 26. Διαδικασία τροφάλλαξης μεταξύ συλλέκτριας και παραλήπτριας (αποθηκάρου) μέλισσας.	63
Εικόνα 27. Απεικόνιση της διαδικασίας της επικονίασης.	69
Εικόνα 28. Παγκόσμια παραγωγή μελιού για το έτος 2022. FAOSTAT	70
Εικόνα 29. Αριθμός κυψελών ανά χώρα στην ΕΕ (αριστερά), και συνολικά στην ΕΕ (δεξιά).	72
Εικόνα 30. Αριθμός κυψελών που αντιστοιχούν ανά μελισσοκόμο ανάμεσα στις χώρες κράτη της ΕΕ.	72
Εικόνα 31. Πειραματικός σχεδιασμός.	74
Εικόνα 32. Μέθοδος Folin - Ciocalteu	78
Εικόνα 33. Μηχανισμός αντίδρασης 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ (DPPH) με αντιοξειδωτικό παράγοντα. R: H = αντιοξειδωτικός παράγοντας. R = σχηματιζόμενη ρίζα του αντιοξειδωτικού παράγοντα	80
Εικόνα 34. Παραγωγή της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του HRP στην αντίδραση	82
Εικόνα 35. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA.	83
Εικόνα 36. Αναγωγή του σιδήρου και αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης	88
Εικόνα 37. Παράδειγμα πηκτώματος αгарόζης για ένα από τα δείγματα της παρούσας διατριβής.	92

Εικόνα 38. HepG2. Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα.	110
Εικόνα 39. MKN45. Ανθρώπινη καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά.	110
Εικόνα 40. RAW264.7. Καρκινική σειρά μακροφάγων κυττάρων ποντικού	111
Εικόνα 41. Μετατροπή του τετραμμωνιακού άλατος (ΧΤΤ) στην αντίστοιχη φορμαζάνη. .	112
Εικόνα 43. Πλάκα Neubauer.	112
Εικόνα 44. Κυτταρομετρία ροής.....	114
Εικόνα 45. Παράδειγμα διαγραμμάτων διασποράς και ιστογράμματα όπως προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής. Τα διαγράμματα είναι αντιπροσωπευτικά ενός δείγματος μελιού (Α)ομάδα ελέγχου, (Β) 25 mg/ml, (C) 12,5 mg/ml, (D) 6,25 mg/ml και (Ε) 3,125 mg/ml.....	116

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές	25
Πίνακας 2. Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών	49
Πίνακας 3. Στοιχεία αναφορικά με την τοποθεσία των κυψελών και την ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην Διατριβή	77
Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.	79
Πίνακας 5. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	80
Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	82
Πίνακας 7. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	84
Πίνακας 8. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	86
Πίνακας 9. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	88
Πίνακας 10. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση.....	91
Πίνακας 11. Αποτελέσματα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων μελιού (TPC) μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu.	94
Πίνακας 12. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων	117
Πίνακας 13. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο TAC.	119
Πίνακας 14. Αποτελέσματα μεθόδου ΧΤΤ.	122
Πίνακας 15. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ανηγμένης	139
Πίνακας 16. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC στο πλάσμα.	140
Πίνακας 17. Αποτελέσματα αναφορικά με την in vitro αξιολόγηση της εμπορικά διαθέσιμης γέλης μελιού.....	143
Πίνακας 18. Αποτελέσματα γενικής εξέτασης αίματος (CBC). WBC: White blood cells, LYM: Lymphocytes, MON: monocytes, GRA: granulocytes, RBC: red blood cells, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red blood cell distribution width, PLT: platelets, MPV: mean platelet volume, PCT: volume occupied by platelets in the blood as a percentage, PDW: Platelet Distribution Width. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).....	144
Πίνακας 19. Αποτελέσματα φυσιολογικών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).	145

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (GAE)	79
Διάγραμμα 2. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	94
Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο DPPH.	95
Διάγραμμα 4. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	96
Διάγραμμα 5. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου DPPH.	96
Διάγραμμα 6. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο ABTS.	97
Διάγραμμα 8. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου ABTS.	97
Διάγραμμα 7. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	97
Διάγραμμα 9. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των μελιών με την μέθοδο OH•.	98
Διάγραμμα 11. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου OH •.	98
Διάγραμμα 10. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	98
Διάγραμμα 12. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο O2 ^{•-}	99
Διάγραμμα 14. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου O2 ^{•-}	100
Διάγραμμα 13. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	100
Διάγραμμα 15. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού ως προς την αναγωγική ικανότητα.	100
Διάγραμμα 17. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του AU0,5 της μεθόδου Reducing Power.	101
Διάγραμμα 16. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	101
Διάγραμμα 18. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των μελιών ως προς την ικανότητα τους να προστατεύουν το DNA από βλάβες επαγόμενες από ρίζες περοξυλίου.	102
Διάγραμμα 19. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).	102
Διάγραμμα 20. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50.	102
Διάγραμμα 21. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης.	118
Διάγραμμα 22. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Βελανιδιάς σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	123
Διάγραμμα 23. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Γαλάζιο αγκάθι σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	124

Διάγραμμα 24. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Δάσους σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	125
Διάγραμμα 25. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Δάσους με μελιτώματα βελανιδιάς σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	126
Διάγραμμα 26. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Ανθόμελο (1) σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	127
Διάγραμμα 27. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Ανθόμελο (2) σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.	128
Διάγραμμα 28. Επιδράσεις της γέλης μελιού στα επίπεδα της (Α) GSH, (Β) TAC, και της (C) CAT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.	146
Διάγραμμα 29. Επιδράσεις της γέλης μελιού στα επίπεδα των (Α) TBARS, και (Β) Protein carbonyls (PCARBS). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.	147

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

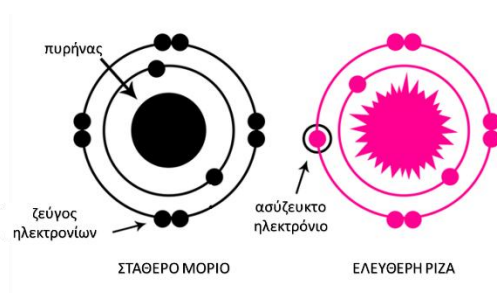
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RNS	Reactive Nitrogen Species	Δραστικές μορφές αζώτου
RSS	Reactive sulfur species	Δραστικές μορφές θείου
RCS	Reactive chlorine species	Δραστικές μορφές χλωρίου
O₂^{•-}	Superoxide radical	Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος
HO[•]	Hydroxyl radical	Ρίζα υδροξυλίου
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
NO	Nitric oxide	Μονοξείδιο του αζώτου
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Catalase	Καταλάση
GSH	Reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Oxidized glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
DPPH[•]	1,1-didhenyl-2 picrylhydrazyl	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτιδικό νικοτιναμίδιο αδενίνης
ADP	Adenosine diphosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
XO	Xanthine oxidase	Οξειδάση της ξανθίνης
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
ARE	Antioxidant Response Elements	Στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης
L[•]	Lipid radical	Λιπιδική ρίζα
LOO[•]	Lipid peroxy radical	Ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου

GAE	Gallic acid	Γαλλικό οξύ
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)	2,2'-αζωτο (υδροχλωρικό 2-αμιδινοπροπάνιο)
GST	Glutathione S-Transferase	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Glutathione reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
HRP	Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του χρένου
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
NrF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Πυρηνικός παράγοντας ερυθροειδούς 2
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch-like ECH- συνδεδεμένη πρωτεΐνη 1
RBCL	Red blood cell lysate	Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα
TAC	Total antioxidant capacity	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS	Thiobarbituric Reactive Substances	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
TBA	Thiobarbituric acid	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
MDA	Malondialdehyde	Μηλονική διαλδεΰδη
PCARB	Protein carbonyls	Πρωτεϊνικά καρβονύλια
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
PBS	Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	διθειο-δυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο, μόριο ή ιόν που στην εξωτερική του στιβάδα υπάρχει ένα ασύζευκτο (μονήρες) ηλεκτρόνιο με ικανότητα να υφίσταται ως ανεξάρτητο. Η διαφορά αυτή καθιστά το μόριο ασταθές και δραστικό. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν εν δυνάμει να έχουν έναν ή περισσότερους ομοιοπολικούς δεσμούς οι οποίοι κατά περίπτωση δύναται να χαρίσουν ιδιαίτερα υψηλή δραστικότητα (χημικά) έναντι σε άλλες χημικές ουσίες, καθώς και ελεύθερες ρίζες που ανήκουν στο ίδιο είδος. Με στόχο την αποκατάσταση της ελλιπούς σταθερότητας, μπορούν να αποσπάσουν ένα ηλεκτρόνιο από διπλανά μόρια καθιστώντας το δεύτερο αυτό μόριο ελεύθερη ρίζα (Εικόνα 1). Αυτή η διαδικασία είναι η αρχή μιας αλυσιδωτής αντίδρασης που μπορεί να επιφέρει επιβλαβή αποτελέσματα στο κύτταρο ^{1,2}.



Εικόνα 1. Απεικόνιση ενός σταθερού μορίου (αριστερά) και μιας ελεύθερης ρίζας (δεξιά) κύτταρο ^{1,2}.

Κατά την αρχική τους αξιολόγηση και μελέτη οι ελεύθερες ρίζες θεωρήθηκαν αποκλειστικά επιβλαβείς αφού συνδέθηκαν μόνο με κυτταρικές βλάβες όπου λειτουργώντας συνδυαστικά οδηγούσαν τελικά σε παθολογικές καταστάσεις όπως η καρκινογένεση, ενώ συνδέθηκαν και με την εκφυλιστική διαδικασία της γήρανσης ¹. Παρά την αρχική εκτίμηση, με το πέρασ των χρόνων αποδείχθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες για την φυσιολογία του κυττάρου αφού οι οργανισμοί ανέπτυξαν μηχανισμούς για την προς όφελός τους εκμετάλλευση των ελευθέρων ριζών. Σε αυτούς τους μηχανισμούς συμπεριλαμβάνονται, η ενίσχυση μεταγωγής σήματος από ορισμένους μεμβρανικούς υποδοχείς (π.χ. αντιγόνου των λεμφοκυττάρων), η ρύθμιση λειτουργιών συναρτήσει της συγκέντρωσής τους, καθώς και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης ³. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται διαρκώς είτε ως

φυσιολογικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού ή/και ως αποτέλεσμα κυτταρικών διεργασιών είτε ως απόρροια εξωτερικών παραγόντων όπως η άσκηση και η έκθεση σε παράγοντες σαν την ατμοσφαιρική ρύπανση ⁴. Το κεντρικό άτομο της ρίζας καθορίζει την κατηγορία στην οποία ανήκει. Ρίζες με κεντρικό άτομο το: οξυγόνο χαρακτηρίζονται σαν Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), άζωτο χαρακτηρίζονται σαν Δραστικές Μορφές Αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS), θείο χαρακτηρίζονται σαν Δραστικές Μορφές Θείου (Reactive Sulfur Species, RSS), και χλώριο χαρακτηρίζονται σαν Δραστικές Μορφές Χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS). Στις δραστικές μορφές συγκαταλέγονται και μη ριζικά παράγωγα που ορίζονται ως μη ρίζες (Πίνακας 1). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πιο δραστικές και λιγότερο σταθερές από τις αντίστοιχες μη ρίζες. Τα μη ριζικά παράγωγα μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η ρίζα υδροξυλίου OH[•] που μπορεί να σχηματιστεί παρουσία H₂O₂ και κάποιου μετάλλου μετάπτωσης όπως ο χαλκός ή ο σίδηρος ⁵⁻⁷. Οι δραστικές μορφές μπορούν να δημιουργηθούν μη ενζυμικά ως αποτέλεσμα αντίδρασης του κεντρικού τους ατόμου με οργανικές ενώσεις, και ενζυμικά ⁸.

Πίνακας 1. Δραστικές Μορφές

ROS	O ₂ ^{•-}	Ανιόν σουπεροξειδίου
	OH [•]	Ρίζα υδροξυλίου
	ROO [•]	Ρίζα υπεροξειδίου
	H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο υδρογόνου
	O ₃	Μονήρες οξυγόνο
	¹ O ₂	Όζον
RNS	NO [•]	Μονοξείδιο αζώτου
	NO ^{2•}	Διοξείδιο αζώτου
	HNO ₂	Νιτρώδες οξύ
	ONOO ⁻	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν
RSS	RS [•]	Ρίζα θείου
	H ₂ S	Θειούχο υδρογόνο
RCS	Cl [•]	Ρίζα χλωρίου
	HOCl	Υποχλωριώδες οξύ

1.1.1 Κυριότερες δραστικές μορφές

- ο Ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$)

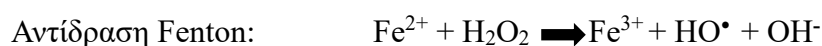
Η ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) προκύπτει από την εξίσωση:



Παρά το γεγονός ότι η $O_2^{\bullet -}$ παράγεται κατά βάση στα μιτοχόνδρια έχει χαμηλή ικανότητα αλληλεπίδρασης με άλλα μακρομόρια. Ο σχηματισμός της προκύπτει από την ατελή αναγωγή του οξυγόνου (με ένα ηλεκτρόνιο) σε νερό κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Λόγω του αρνητικού της φορτίου δεν είναι ικανό να διαπεράσει τη μεμβράνη ⁶. Κατά την προσπάθειά τους να αντιμετωπίσουν κάποια φλεγμονή τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράξουν ρίζες $O_2^{\bullet -}$, μια διαδικασία που ονομάζεται «αναπνευστική έκρηξη» και περιλαμβάνει την δραστικότητα του ενζύμου NADPH οξειδάση. Εκτός της NADPH οξειδάσης, η ρίζα σουπεροξειδίου μπορεί να προκύψει κι από άλλα ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η κυκλοξυγενάση ⁹.

- ο Ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$)

Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να παραχθεί από την αντίδραση Fenton μέσω της αλληλεπίδρασης του H_2O_2 με κάποιο μέταλλο μετάπτωσης (πχ Fe^{2+}) του οποίου ο βασικός ρόλος είναι η επιτάχυνση της αντίδρασης.

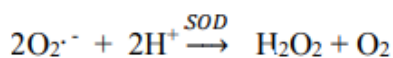


Πρόκειται για μια ιδιαίτερα δραστική ρίζα λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής της. Έχει την δυνατότητα να αλληλοεπιδρά και να επηρεάζει οποιοδήποτε μακρομόριο βρεθεί πλησίον της προκαλώντας εκτεταμένες βλάβες σε DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια ^{4,10}.

- ο Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Χαρακτηρίζεται ως μη ρίζα, χωρίς φορτίο εξαιτίας του οποίου μπορεί και διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Το H_2O_2 έχει την ικανότητα να παράγει ιδιαιτέρως επιβλαβείς ρίζες όπως αυτές του υδροξυλίου όπως περιγράφεται παραπάνω. Η τοξικότητά της λοιπόν είναι αναλογική της ικανότητάς της να παράγει $OH^{\bullet}$. Ο βασικός τρόπος παραγωγής της είναι μέσω της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), ωστόσο

ένζυμα όπως η οξειδάση της γλυκόζης μπορούν επίσης να το παράξουν αφού χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα για να μεταφέρουν e^- .



Ένζυμα όπως η καταλάση και η γλουταθειόνη έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την δράση του ⁸.

- ο Ρίζα περοξυλίου ($ROO^\bullet$)

Οι ρίζες περοξυλίου ($ROO^\bullet$) είναι δευτερογενείς ROS που προέρχονται από την προσθήκη υπεροξειδίου σε μια ρίζα με επίκεντρο τον άνθρακα, όπως η ρίζα υδροπεροξυλίου ή η ρίζα υπεροξυλίου. Όταν δύο ρίζες υπεροξυλίου αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας ασταθή στοιχεία (τετραοξείδιο, RO_4R), κατακερματίζονται τελικά σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπεροξείδιο ή διάφορες υδροξυλιωμένες ενώσεις. Αυτού του είδους οι αντιδράσεις είναι κυρίως υπεύθυνες για την υπεροξείδωση των λιπιδίων ¹¹.

- ο Μονοξείδιο του αζώτου ($NO^\bullet$)

Το $NO^\bullet$ παράγεται από την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), το μοριακό βάρος του οποίου κυμαίνεται από 110kDa έως 160kDa ανάλογα με την ισομορφή. Υπάρχουν τρεις ισομορφές συνθετασών: η νευρωνική NOS (NOS1) η οποία παρίσταται στα περισσότερα είδη κυττάρων παρά το γεγονός ότι αρχικά βρέθηκε στον νευρικό ιστό; η ενδοθηλιακή NOS (NOS3) και η επαγωγίμη NOS (NOS3) που εντοπίζονται σε καταστάσεις αντιμετώπισης φλεγμονής ¹². Η σύνθεση του $NO^\bullet$ στους περισσότερους τύπους κυττάρων ξεκινάει από την L-αργινίνη η οποία με την χρήση των NOS και του NADPH την μετατρέπουν σε L-κιτρουλίνη. Καθώς το NO είναι ασθενής αναγωγικός παράγοντας, αντιδράει με το μονήρες οξυγόνο σχηματίζοντας NO_2 το οποίο αντιδρά με το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζοντας τελικά $ONOO^\bullet$ ⁶.

- ο Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)

Η μυελοπεροξειδάση αντιδρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου για την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος. Το υποχλωριώδες οξύ παράγεται σε μεγάλο βαθμό από τα ουδετερόφιλα και έχει την ικανότητα να καταστρέφει μια ποικιλία μακρομορίων

οξειδώνονταςθειόλες, λιπίδια, ασκορβικό οξύ και NADPH. Επιπλέον, το υποχλωριώδες οξύ μπορεί να εισέλθει στις κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλέσει θραύση και συσσωμάτωση πρωτεϊνών στην όξινη κατάστασή του ¹³.



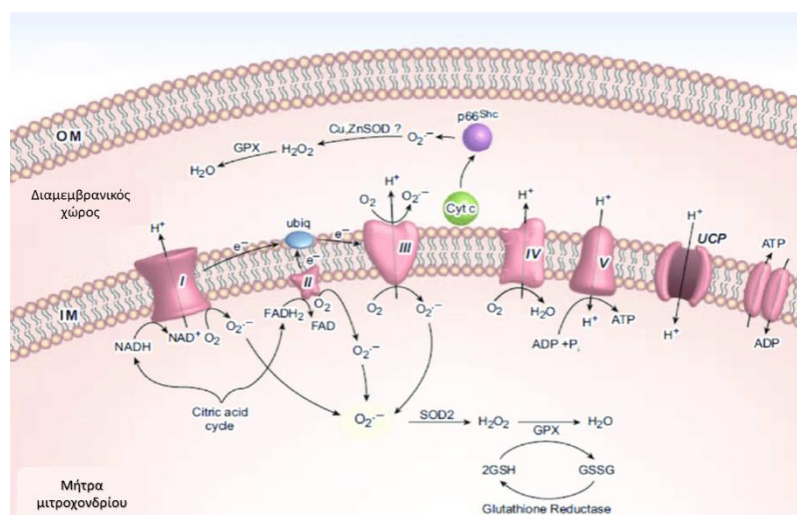
1.1.2 Παραγωγή Ελευθέρων ριζών

1.1.2.1 Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν τόσο ως φυσιολογικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού όσο κι από άλλες διεργασίες όπως η δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ως ενδογενείς πηγές ελευθέρων ριζών συνυπολογίζονται και κυτταρικά όργανα όπως τα υπεροξυσώματα και τα μιτοχόνδρια στα οποία αυξάνεται η δαπάνη οξυγόνου ⁴.

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η μετατροπή του ADP σε ATP εξαρτάται από οξειδωτικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, για τον λόγο αυτό η διαδικασία παραγωγής του (ATP) ονομάστηκε οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η μεταβολική αυτή διαδικασία παράγει το μεγαλύτερο ποσοστό ενέργειας που χρειάζεται ένας αερόβιος οργανισμός, αλλά παράλληλα αποτελεί και κύρια ενδοκυττάρια πηγή ελευθέρων ριζών ¹⁴. Η διαδικασία αφορά την μετακίνηση ηλεκτρονίων στο O₂ με τελικό σκοπό την δημιουργία μορίων H₂O. Στην σειρά αντιδράσεων της οξειδωτικής



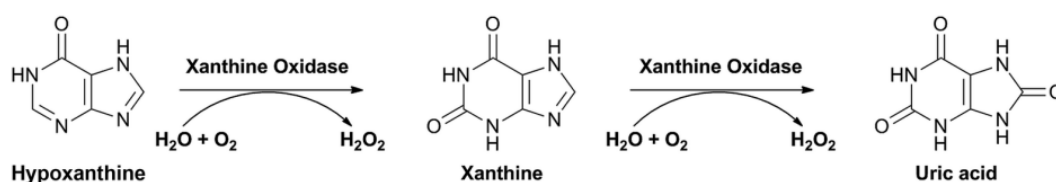
Εικόνα 2. Παραγωγή ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση ¹⁴.

φωσφορυλίωσης λαμβάνουν μέρος τα μόρια NADH ή/και FADH₂ τα οποία είναι αποτέλεσμα της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος. Τα μόρια αυτά διαθέτουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού εύκολα

μεταβιβάσιμο σε άλλα μόρια το οποίο επιφέρει την οξείδωση τους, διαδικασία που συμβαίνει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αφού τα ηλεκτρόνια αυτά φτάσουν στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ανάγονται σε οξυγόνο και νερό. Κατά την διαδικασία αυτή ένα ποσοστό των e^- καταλήγουν να παράγουν $O_2^{\bullet-}$ ή / και H_2O_2 , αφού πρώτα συνδεθούν στο οξυγόνο. Ενώ τέλος, αυτά τα μόρια έχουν την δυνατότητα μέσω αντιδράσεων να παράγουν $OH^{\bullet}$ ¹⁵⁻¹⁸.

Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (XO)

Η XO δρα στον νεφρό και το ήπαρ. Η αφυδρογονάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση της οξείδωσης της υποξανθίνης και ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Όσον αφορά την ενεργή της μορφή (τύπος D), αποτελεί το 90% του αποθέματος στους υγιείς ιστούς, μεταφέροντας e^- στο NAD^+ . Το υπολειπόμενο 10% (τύπος O) σχηματίζει $O_2^{\bullet-}$ μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο. Ο τύπος O οφείλει την ύπαρξή του στην οξείδωση κάποιων σουλφυδρυλικών ομάδων ($-SH$) του ενζύμου ή σε αποσπασματική πρωτεόλυσή του. Άξιο αναφοράς είναι ότι η μετατροπή αυτή αφορά ισχαιμικούς ιστούς, αφού σε αυτές τις περιπτώσεις το οξυγόνο μειώνεται σημαντικά ¹⁹⁻²¹. Ενώ η οξειδάση της ξανθίνης είναι κυτταρπλασματικό ένζυμο, είναι δυνατό να εμφανιστεί στην κυκλοφορία όπου προσκολλάται στα τοιχώματα των ενδοθηλιακών κυττάρων καταλήγοντας σε τοπική αύξηση των δραστικών μορφών. Εξαιτίας αυτής της ικανότητάς της, η δράση της έχει συσχετισθεί με καρδιαγγειακές παθολογικές καταστάσεις ²².



Εικόνα 3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης ²².

Ανοσοποιητικό σύστημα – Αντιμετώπιση φλεγμονής

Με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση κάποιου παθογόνου που έχει εισχωρήσει στον οργανισμό, ενεργοποιούνται τα φαγοκύτταρα το οποίο φέρει ως αποτέλεσμα την

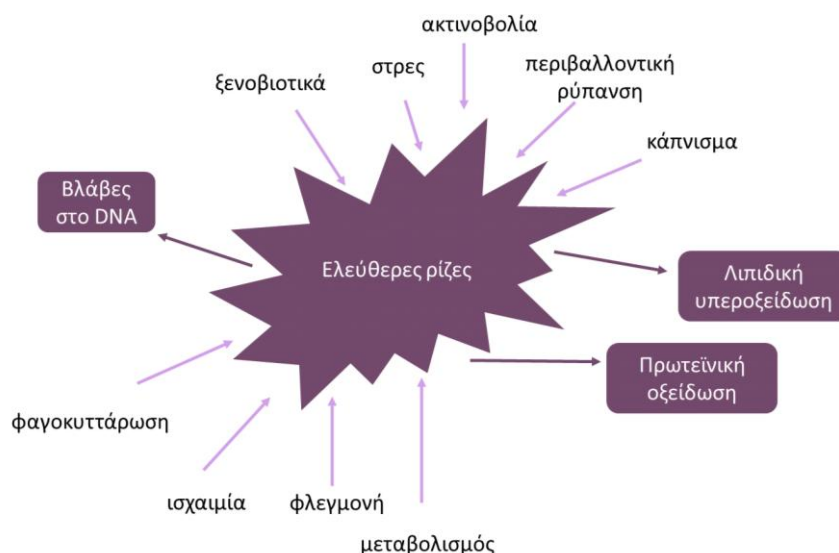
παραγωγή $O_2^{\bullet-}$. Ειδικότερα, η σύνδεση κάποιου αντιγόνου με τους μεμβρανικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων ενεργοποιεί την NADPH οξειδάση που σε φυσιολογικές συνθήκες είναι ανενεργή ²³. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το οξυγόνο καταναλώνεται σε ιδιαίτερα αυξημένο ρυθμό επιφέροντας αύξηση στην παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ οι οποίες καταλύονται από το ένζυμο SOD καταλήγοντας στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και τελικά ριζών OH μέσω της αντίδρασης Fenton ²⁴. Αυτή η διαδικασία αποτελεί έναν εκ των βασικότερων μηχανισμών άμυνας αλλά και παραγωγής ROS ²⁵.

Ένζυμα του κυτοχρώματος p450

Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος p450 που εμπλέκονται στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών της φάσης I παράγουν δραστικές μορφές. Πιο συγκεκριμένα, στην προσπάθειά τους να απομακρύνουν τα ξενοβιοτικά αυξάνουν την πολικότητα τους, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NAD(P)H στο οξυγόνο, οξειδώνοντας ταυτόχρονα το υπόστρωμά τους ²⁶.

1.1.1.2 Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών προκύπτει και εξωγενώς (Εικόνα 4). Το κάπνισμα, το εκτεταμένο στρες, η έντονη άσκηση και το αλκοόλ είναι παράγοντες που σχετίζονται με τον σύγχρονο τρόπο ζωής αποτελώντας παράλληλα σημαντική πηγή ROS. Εκτός από την ιονίζουσα και την UV ακτινοβολία, ξενοβιοτικές ουσίες που βρίσκονται σε φυτοφάρμακα και απόβλητα βιομηχανιών είναι επίσης ικανά να προάγουν την παραγωγή ROS ⁴.



Εικόνα 4. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών ⁴.

1.1.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

1.1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αρχικά οι ελεύθερες ρίζες θεωρήθηκαν λανθασμένα ότι επιφέρουν μόνο δυσμενή αποτελέσματα στον οργανισμό. Οι αερόβιοι μηχανισμοί εκμεταλλευόμενοι τις ελεύθερες ρίζες, εκτελούν διεργασίες όπως η μεταγωγή σήματος, ο πολλαπλασιασμός και η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, έχοντας έτσι καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης. Η ισορροπία μεταξύ της διατήρησης της ομοιόστασης και της αρνητικής επίδρασής τους σε βιομόρια είναι λεπτή και εξηγείται από το φαινόμενο της όρμησης (hormesis) ^{27,28}.

1.1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις

Όταν οι δραστικές μορφές βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι ικανές αλληλοεπιδρώντας με μακρομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA να προκαλέσουν δομικές αλλαγές ακόμη και κυτταρικό θάνατο ^{4,29}. Οι υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκύψουν είτε από αδυναμία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών για επιδιόρθωσή, είτε από υπερπαραγωγή δραστικών μορφών. Η κατάσταση κατά την οποία τα οξειδωτικά μόρια υπερβαίνουν τα αντιοξειδωτικά (οξειδωτικό στρες), έχει συνδεθεί με διάφορες

παθολογικές καταστάσεις. Η περίσσεια αυτή των ελευθέρων ριζών είναι δυνατό να επιφέρει βλάβες στα μακρομόρια, οδηγώντας σε υπολειτουργία των ιστών³⁰⁻³⁴.

- ο Νουκλεϊκά οξέα

Τόσο το DNA όσο και το RNA υπόκεινται σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες με το RNA να είναι πιο επιρρεπές κυρίως επειδή είναι μονόκλωνο. Το RNA στερείται επιδιορθωτικού μηχανισμού, ωστόσο οι βλάβες στο DNA επιφέρουν πιο σημαντικές δυσλειτουργίες με το μιτοχονδριακό DNA να είναι πιθανότερο να επηρεαστεί λόγω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης άρα και της αυξημένης παραγωγής ROS¹.

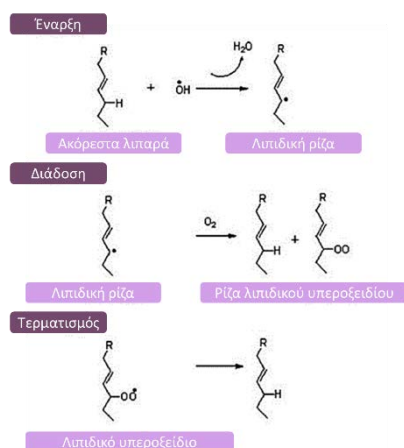
Η κύρια ρίζα που προκαλεί τις βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα είναι η ρίζα υδροξυλίου που συνήθως προκαλεί είτε θραύσματα σε DNA και RNA είτε τροποποίηση των βάσεων με πιο επιρρεπή την θυμίνη και την κυτοσίνη. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα μεταλλάξεις οι οποίες υπό προϋποθέσεις οδηγούν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις^{23,35-38}.

- ο Πρωτεΐνες

Τα αμινοξέα λόγω της οξείδωσής τους από τις ελεύθερες ρίζες, δύνανται να χάσουν την δομική τους λειτουργία, αφού τα οξειδωμένα αμινοξέα έχουν την τάση να σχηματίζουν δεσμούς πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, τα λεγόμενα cross links. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυμικής δράσης τους, της λειτουργίας των υποδοχέων καθώς και των πρωτεϊνών αναφοράς³⁹.

Ελεύθερες ρίζες όπως οι $O_2^{\bullet-}$ και $OH^{\bullet}$, καθώς και μη ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι αυτές που συνήθως προκαλούν βλάβες σε πρωτεϊνικά αμινοξέα όπως η λυσίνη και η προλίνη, παράγοντας πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για τον λόγο αυτό η μέτρηση των καρβονυλοπαράγωγων θεωρείται ένας έμπιστος δείκτης προσδιορισμού βλάβης των πρωτεϊνών από δραστικές μορφές οξυγόνου, αφού η αύξησή του συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου υποδηλώνει αύξηση της βλάβης⁴⁰⁻⁴² και οξειδωμένων αμινοξέων⁴³. Επιπλέον, οι ROS φαίνεται να μεταβάλουν την λειτουργία των κυριότερων μονοπατιών αποικοδόμησης πρωτεϊνών (το λυσοσωμικό σύστημα και το πρωτεάσωμα) καταλήγοντας σε συσσώρευση των οξειδωμένων πλέον πρωτεϊνών⁴⁴.

ο Λιπίδια

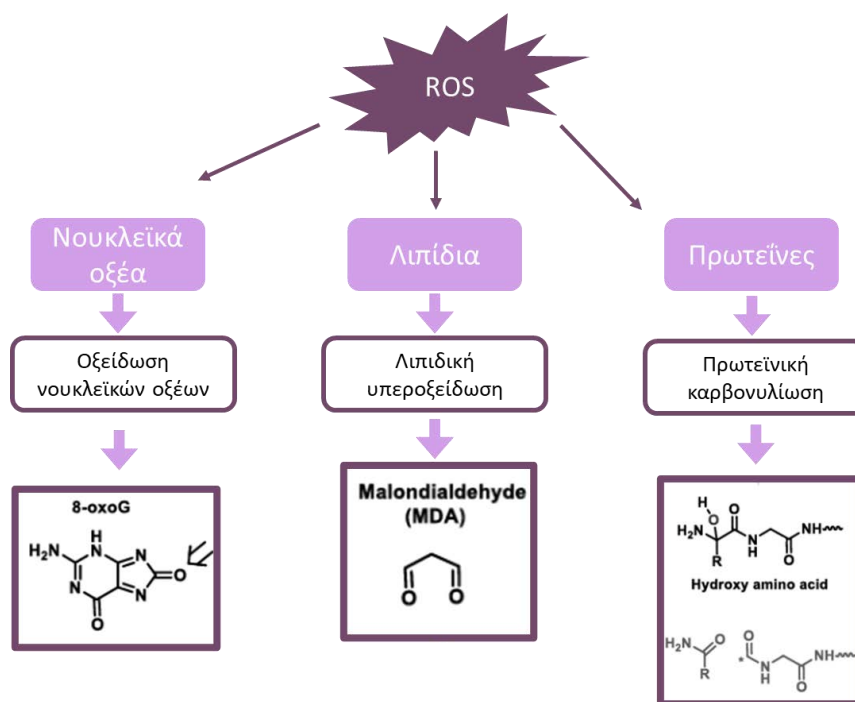


Εικόνα 5. Μετατροπή των λιπιδίων σε ρίζα ⁴⁷.

Βασικός στόχος των ελευθέρων ριζών είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Όταν τα λιπίδια αντιδρούν με δραστικές μορφές υπόκεινται σε μια επιβλαβή για την λειτουργία των κυττάρων αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης. Ο προσδιορισμός των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι μείζονος σημασίας καθώς αυξημένα επίπεδα αυτής συνήθως οδηγούν σε μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης και αύξηση της διαπερατότητας, επιφέροντας μειωμένη κίνηση των e^- στο ενδοπλασματικό δίκτυο και

μεταβολές των μιτοχονδιακών λειτουργιών ^{1,45,46}

Κατά την έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης δημιουργείται μια λιπιδική ρίζα ($\text{L}^\bullet$), αφού οι δραστικές μορφές οξυγόνου προσβάλουν τα λιπαρά οξέα, αφήνοντας το μεθυλένιο χωρίς υδρογόνο. Στην προσπάθεια της να δημιουργήσει μια πιο σταθερή ρίζα, η $\text{L}^\bullet$ συλλέγει e^- από άλλα μόρια σχηματίζοντας μια ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου ($\text{LOO}^\bullet$). Η $\text{LOO}^\bullet$ αναδιατάσσεται σχηματίζοντας ενδοπεροξείδια, τα οποία εν τέλει σχηματίζουν μηλονική αλδεϋδη (MDA) και 4-υδροξυνονενάλη (4-HNE), προϊόντα που είναι επιβλαβή τόσο για το DNA όσο και για τις πρωτεΐνες ⁴⁷. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου να σχηματιστεί ένα αδρανές προϊόν κατά τη φάση λήξης ^{36,48,49}.

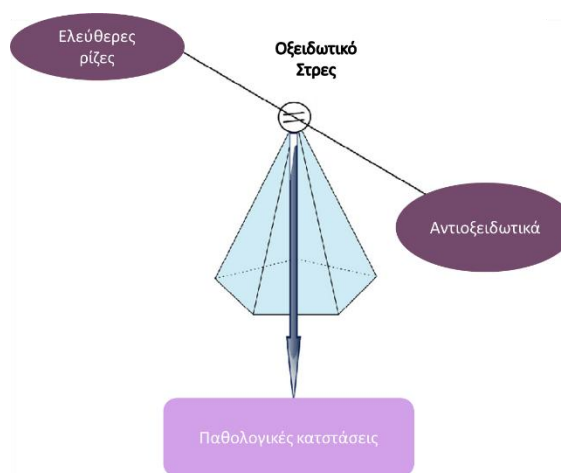


Εικόνα 6. Επίδραση των ελευθέρων ριζών στα μακρομόρια ³⁶.

1.2 Οξειδωτικό στρες

Για πρώτη φορά ο ορισμός του οξειδωτικού στρες διατυπώθηκε στο βιβλίο του Helmut Sies με τίτλο «Οξειδωτικό στρες (Oxidative Stress)» το 1985, χαρακτηρίζοντάς το ως: «η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων» ⁵⁰. Τα επόμενα χρόνια έγιναν πολλές μελέτες σχετικά με το φαινόμενο οδηγώντας στην ανανέωση του ορισμού από τον Jones το 2006 σε «διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης» ⁵¹ καταλήγοντας στον επικρατέστερο ορισμό που περιγράφει το οξειδωτικό στρες ως «η διαταραχή προοξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη» ⁵². Η ανισορροπία μπορεί να

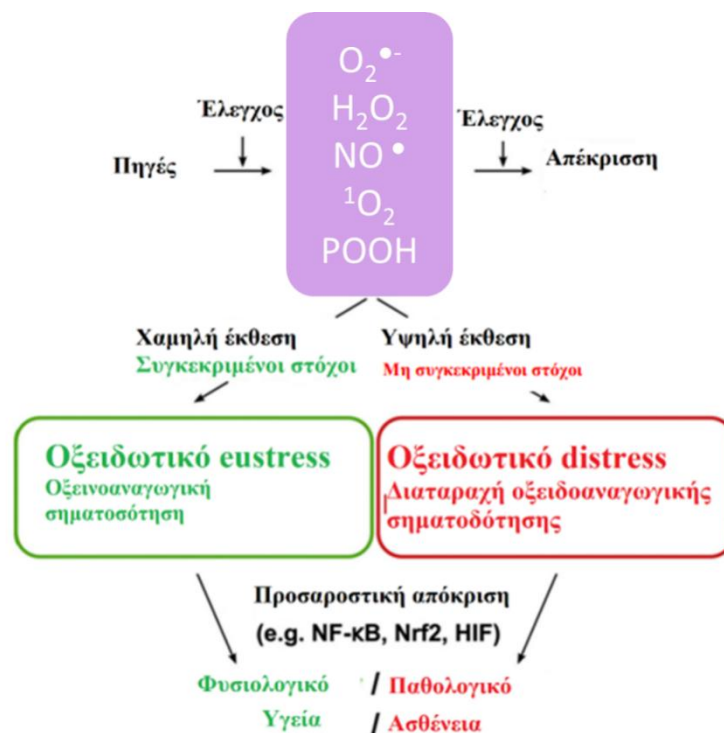
προέλθει είτε λόγω της μείωσης των αντιοξειδωτικών είτε λόγω της ραγδαίας αύξησης των δραστικών μορφών ή/και συνδυασμό αυτών. Στην πρώτη περίπτωση αυτό μπορεί να οφείλεται στην εξάντληση των αντιοξειδωτικών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, σε μετάλλαξη ή στην έλλειψη κάποιου συμπαράγοντα. Η δεύτερη περίπτωση είναι συνήθως αποτέλεσμα ορισμένου τοξικού



Εικόνα 7. Οξειδωτικό στρες⁵².

παράγοντα στον οποίο εκτέθηκε ο οργανισμός ή ενεργοποίησης κάποιου μηχανισμού όπως πχ για την αντιμετώπιση κάποιας φλεγμονής⁵³. Από τις πρώτες αναφορές το οξειδωτικό συνδέθηκε με πολλές ασθένειες όπως ο διαβήτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος κ.α., χωρίς όμως να είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν η εμφάνιση του είναι μια από τις αιτίες ή εμφανίζεται σαν αποτέλεσμα της ασθένειας^{46,54–59}.

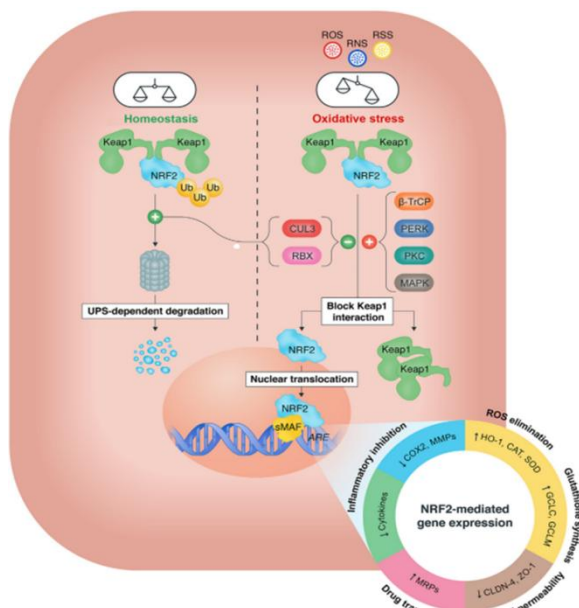
Εξ ορισμού, το οξειδωτικό στρες κατηγοριοποιείται αναλογικά της έντασής του. Πιο συγκεκριμένα το χαμηλής έντασης που ονομάζεται φυσιολογικό (oxidative eustress) είναι απαραίτητο για την ομοιόσταση, ενώ το υψηλής έντασης που ονομάζεται παθοφυσιολογικό (oxidative distress) είναι τοξικό και επιβαρύνει τον οργανισμό καταστρέφοντας τα βιομόρια. Επιπλέον, υπάρχει και το αναγωγικό στρες στο οποίο έχουμε μείωση των οξειδωτικών υπό του φυσιολογικού. Σαν όρος εισήχθη το 1987 ώστε να περιγράψει την μεταβολική έναρξη του οξειδοαναγωγικού κύκλου του σιδήρου που ακολουθείται από την αυξημένη παραγωγή του ανηγμένου NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide). Πρόσφατη έρευνα για το αναγωγικό στρες διαφοροποίησε την μεταβολική σημασία σε προσαρμοστικό μεταβολικό προγραμματισμό στην υποξία. Παραδόξως, τα παραπάνω αναγωγικά ισοδύναμα είναι ικανά να επάγουν το οξειδωτικό στρες^{60–63}.



Εικόνα 8. Η σχέση του οξειδωτικού στρες με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση ⁶⁰⁻⁶³.

1.2.1 Προσαρμογές του κυττάρου για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες

Το κύτταρο διαθέτει μια σειρά από μηχανισμούς ώστε να διατηρεί την ομοιόσταση και την οξειδοαναγωγική του ισορροπία. Μια από τις βασικότερες λειτουργίες του κυττάρου για να ελέγξει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι η μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) στον πυρήνα. Παρά το γεγονός ότι ο Nrf2 δεν διαθέτει ο ίδιος αντιοξειδωτική δράση, λειτουργεί ως ρυθμιστής πληθώρας αντιοξειδωτικών μορίων ⁶⁴. Πιο συγκεκριμένα όταν το κύτταρο βρίσκεται σε φυσιολογική κατάσταση ο Nrf2 είναι προσδεμένος στον Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) στο κυτταρόπλασμα όπου και τον διατηρεί σε χαμηλά επίπεδα μέσω ουβικουτίνωσης και πρωτεασωμικής αποικοδόμησης. Ο Keap1 επιτυγχάνει αυτή τη ρυθμιστική λειτουργία μέσω της ικανότητάς του να συνδέεται με την περιοχή Neh2 του Nrf2, δέσμευση που προκύπτει όταν 2 κατάλοιπα κυστεΐνης του Keap1 αλληλοεπιδρούν με δύο κρίσιμα κατάλοιπα λυσίνης του Nrf2 ^{65,66}.



Εικόνα 9. Ο Nrf2 σε συνθήκη ομοιόστασης (αριστερά) και σε συνθήκη οξειδωτικού στρες (δεξιά) ⁶⁷.

Response Elements), επάγοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται και με την αντιοξειδωτική δράση ⁶⁷.

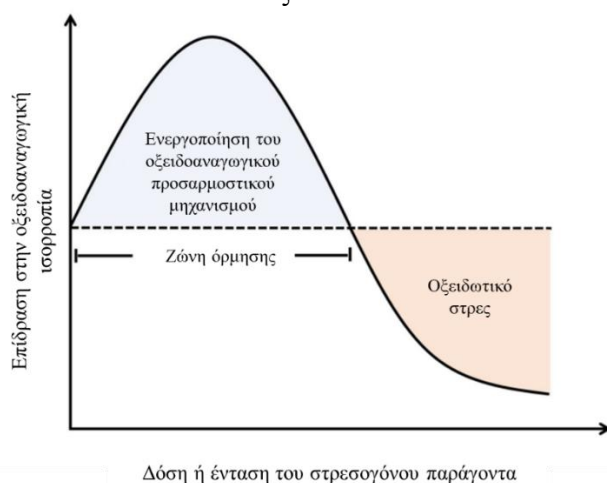
Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του Nrf2, κάποια ενέχονται στη βιοσύνθεση και ανακύκλωση της ανηγμένης γλουταθειόνης, στην αδρανοποίηση των ROS, στην αποθήκευση σιδήρου και τον μεταβολισμό ξеноβιοτικών ⁶⁸. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια στόχοι του Nrf2 μπορούν να κατηγοριοποιηθούν αναλογικά της δράσης τους:

- Ένζυμα που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως πχ: συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (g-GCS), υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), αναγωγή της θειορεδοξίνης (TRx) κ.α.
- Πρωτεΐνες που συνδέονται με την αποτοξικοποίηση, όπως πχ: τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSTs) κινόνη NADP(H), οξειδοαναγωγή (NQO)1, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST_a1 και GSTa3) κ.α ⁶⁹.

Ο Keap1 έχει έναν πολυδιάστατο ρόλο εντός του κυττάρου, αφού στην πραγματικότητα είναι ρυθμιστής διαφόρων διεργασιών, όπως είναι η φλεγμονή, η αυτοφαγία και η ανοσία, με επικείμενη δυσλειτουργία του να συμβάλει στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων ⁷⁰.

Το οξειδωτικό στρες συνήθως επιφέρει μια τροποποίηση του Keap1 αναστέλλοντας την δράση του συμπλέγματος Keap1-CuI3-Rbx1 E3 λιγάση ουβικουτίνης, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του Nrf2. Σε αυτή την περίπτωση ο μεταγραφικός παράγοντας σταθεροποιείται και συσσωρεύεται με αποτέλεσμα την μετατόπιση του στον πυρήνα του κυττάρου όπου αφού συνδεθεί με πρωτεΐνες όπως οι sMaf και οι PMF-1 αλληλοεπιδρά με τα AREs (Antioxidant

Ένας ακόμη προσαρμοστικός μηχανισμός του κυττάρου για την αντιστάθμιση διαταραχών και την αποκατάσταση της ομοιόστασης που προκαλείται από την έκθεση σε ήπια μορφή οξειδωτικού στρες είναι η όρμηση. Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη πως διάφορες εξεταζόμενες ουσίες είναι αποτελεσματικές σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ακολουθώντας ένα γραμμικό πρότυπο, οδηγώντας σε μια έλλειψη γνώσης σχετικά με την έκθεση του οργανισμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις των ίδιων ουσιών^{28,71,72}. Μελέτες των τελευταίων ετών καταδεικνύουν αντίστροφη απόκριση όχι



μόνο σε διάφορες δόσεις χημικών ουσιών και στρεσογόνων παραγόντων, αλλά και βιοδραστικών ενώσεων, ανατρέποντας την αντίληψη της γραμμικότητας και των μοντέλων προσδιορισμού της δόσης με βάση το κατώτατο όριο απόκρισης^{73,74}.

Εικόνα 10. Ορμετική ζώνη^{73,74}.

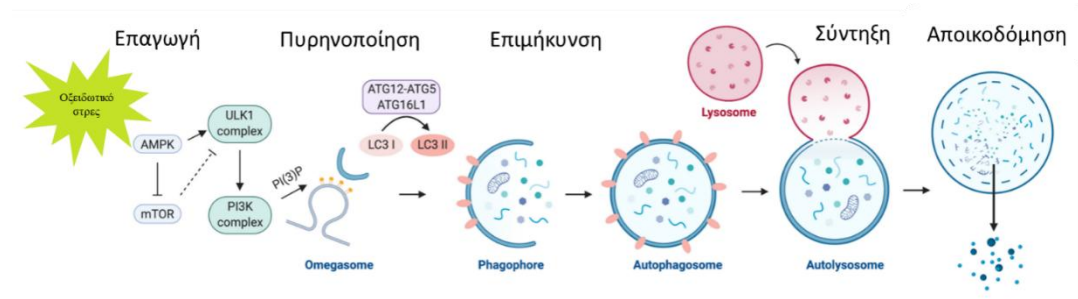
Οι δόσεις μίας ουσίας ή η ένταση ενός στρεσογόνου, χαμηλότερες από εκείνες που οδηγούν σε επιβλαβείς επιδράσεις (δόση κατωφλιού) χαρακτηρίζονται ως «ορμετική ζώνη». Η ζώνη αυτή παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται να εξαρτάται από πολλές παραμέτρους αναλογικά του οργανισμού αλλά και του παράγοντα που εξετάζεται²⁸.

Ευρύ φάσμα βιταμινών και φυτοχημικών ουσιών με θετικές για τον οργανισμό επιδράσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενδέχεται να παρουσιάζουν τοξικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις⁷⁵⁻⁷⁷. Σε αντίθεση με τις βιταμίνες που έχουν άμεση αντιοξειδωτική δράση, οι φυτοχημικές ουσίες δρουν κυρίως μέσω των δευτερογενών μεταβολιτών τους. Η απόκριση στα φυτοχημικά είναι πιθανόν ορμητική αφού μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν παροδική αύξηση παραγωγής δραστικών μορφών στα μιτοχόνδρια⁷⁸. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών μπορεί να σχετίζεται με την μεσογειακή διατροφή και την επιβράδυνση της γήρανσης, ωστόσο οι περισσότερες αναφορές για τέτοιου είδους ουσίες περιορίζονται σε *in vitro* μελέτες, όπου ο βαθμός εντερικής αποδόμησης και απορρόφησης δεν μπορεί να ληφθεί υπόψη⁷⁹⁻⁸¹.

Σε περιπτώσεις εκτεταμένης κυτταρικής βλάβης λόγω του οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται μηχανισμοί με σκοπό την απομάκρυνση του κυττάρου. Μερικοί εξ αυτών είναι οι αυτοφαγία, απόπτωση, και νέκρωση ³¹. Η αυτοφαγία είναι μια μεταβολική διαδικασία που επάγεται με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών συστατικών, ώστε να διατηρηθεί η ομοιόσταση. Πιο συγκεκριμένα προκειμένου να περιορίσει την παραγωγή ROS, μέσω της αυτοφαγίας το κύτταρο αποικοδομεί μιτοχόνδρια και υπεροξεισώματα, δεσμεύοντας ουβικιτινιλωμένες πρωτεΐνες σε υποδοχείς της αυτοφαγίας (πχ. SQTM1, NBRI και NDP52). Επιπλέον μέσω της αυτοφαγίας απομακρύνονται οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, ενώ επάγονται μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Nrf2 που εκφράζει πληθώρα γονιδίων σχετιζόμενα με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία στην οποία υπόκεινται όλα τα κύτταρα σε χαμηλά επίπεδα, ωστόσο ερεθίσματα όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή η υποξία, μπορούν να οδηγήσουν στην αύξησή της. Παρά την αρχικά θετική επίδρασή της, η υπερβολική αυτοφαγία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο καθώς απαιτούνται πολλά συστατικά (λιπίδια, πρωτεΐνες ATG και παράγοντες σηματοδότησης) για την ενεργοποίηση της εξαντλώντας έτσι το κύτταρο ⁸². Εν συντομία τα στάδια της αυτοφαγίας διαχωρίζονται ως εξής:

1. Επαγωγή: Σε αυτό το σημείο αρχίζει να σχηματίζεται μια εξειδικευμένη δομή που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα, στο σημείο που πρόκειται να απορριφθεί.
2. Πυρηνοποίηση: Περιλαμβάνει την προσέλκυση πρόσθετων μορίων (όπως ορισμένες εξειδικευμένες πρωτεΐνες) στο αναπτυσσόμενο αυτοφαγόσωμα.
3. Επιμήκυνση: Το αυτοφαγόσωμα συνεχίζει να αναπτύσσεται περιβάλλοντας πλήρως το υλικό-στόχο. Ολόκληρη αυτή η δομή είναι πλέον γνωστή ως αυτοφαγοσωμάτιο.
4. Σύντηξη: Το αυτοφαγοσωμάτιο συγχωνεύεται με ένα λυσοσωμάτιο, μια εξειδικευμένη κυτταρική δομή που περιέχει πεπτικά ένζυμα σχηματίζοντας ένα αυτολυσόσωμα όταν οι δύο δομές συγχωνεύονται μεταξύ τους.

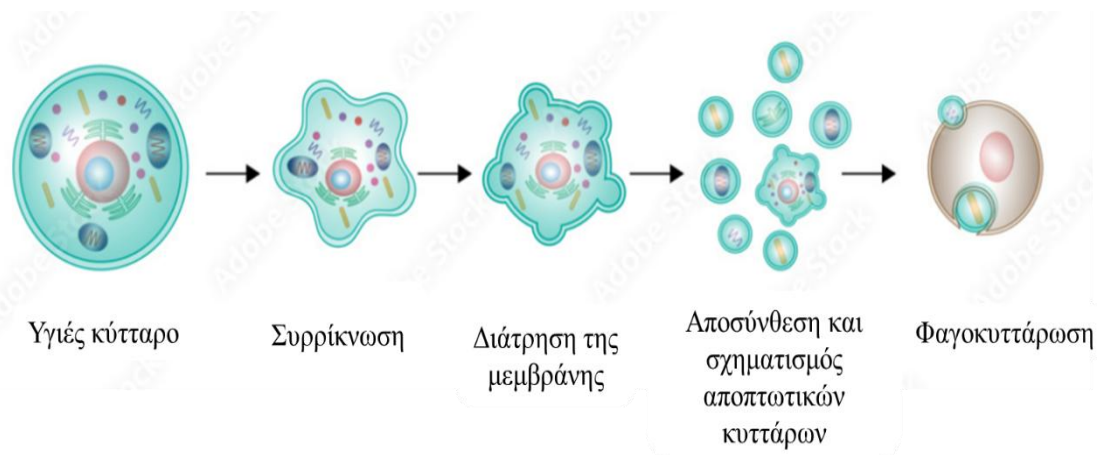
5. Αποικοδόμηση: Τα ένζυμα στο αυτολυσόσωμα διασπούν το υλικό που αποδομείται στα πιο βασικά συστατικά του, τα οποία ο οργανισμός μπορεί στη συνέχεια να επαναχρησιμοποιήσει για τη δημιουργία νέων δομών^{83,84}.



Εικόνα 11. Τα στάδια της αυτοφαγίας^{83,84}.

Η αυτοφαγία ρυθμίζεται αρνητικά από τον mTOR και θετικά από την AMPK. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας περιλαμβάνει τον σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων ULK1 και PI3K. Η πυρήνωση της δομής του αυτοφαγοςώματος περιλαμβάνει τη δημιουργία PI(3)P στο ομεγάσωμα. Η ωρίμανση και επιμήκυνση της μεμβράνης του αυτοφαγοςώματος περιλαμβάνει δύο βήματα σύζευξης που μοιάζουν με ουβικουιτίνη, τη σύζευξη της ATG12 με την ATG5 και τη μετατροπή της LC3 I σε LC3 II. Τα πλήρως σχηματισμένα αυτοφαγοςώματα συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα για την αποικοδόμηση του ενδοκυττάριου περιεχομένου τους και την ανακύκλωση συστατικών μακρομορίων⁸⁵. Σε αντίθεση με τους προηγούμενους, η απόπτωση και η νέκρωση δεν είναι μηχανισμοί επιδιόρθωσης αλλά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Πρόκειται για διαδικασίες μεταξύ των οποίων υπάρχει σύνδεση. Οι δύο αυτές διεργασίες αντιπροσωπεύουν τα δύο άκρα ενός συνεχούς που ποικίλλει ανά κύτταρο, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο φαινότυπος του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από τη διαθέσιμη ενέργεια για την ολοκλήρωση των αποπτωτικών οδών αφού ακόμη και μετά την έκθεση σε τυπικά αποπτωτικά ερεθίσματα, η απόπτωση μπορεί να μετατραπεί σε νέκρωση όταν μειωθούν τα επίπεδα ATP⁸⁶. Συνεπώς, το επίπεδο ATP είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που καθορίζουν την τύχη του κυτταρικού θανάτου: το ίδιο ερέθισμα στα ίδια κύτταρα προκαλεί απόπτωση υπό συνθήκες παροχής ATP, αλλά προκαλεί νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο υπό συνθήκες έλλειψης ATP^{87,88}. Η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι ίσως ο κρισιμότερος παράγοντας του νευρωνικού θανάτου δεδομένου ότι η ακραία ενεργειακή

ανεπάρκεια και η απώλεια μεμβρανικού δυναμικού στα μιτοχόνδρια οδηγεί σε νέκρωση, ενώ η σχετικά άθικτη μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι απαραίτητη για να προχωρήσει η απόπτωση. Η διαδικασία της νέκρωσης μπορεί να αρχίσει μόνο και



Εικόνα 12. Τα στάδια της απόπτωσης ⁸⁶.

αποκλειστικά όταν το κύτταρο πεθαίνει και είναι μια διαδικασία μη αναστρέψιμη ⁸⁹. Το μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από σήματα άλλων κυττάρων (εξωγενώς), είτε από εσωτερικούς μηχανισμούς επιτήρησης. Σε αυτό το στάδιο υπάρχει το περιθώριο της επιδιόρθωσης από το κύτταρο και η διαδικασία είναι αναστρέψιμη. Σε αντίθετη περίπτωση το κύτταρο προχωράει στην ενεργοποίηση της προκασπάσης 9. Σε αυτό το σημείο, το μιτοχόνδριο απελευθερώνει ουσίες στον κυτταροσωλήνα, αφού έχει προηγηθεί η απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού, προκαλώντας την δημιουργία ενός ιοντικού καναλιού γνωστό ως "σύμπλεγμα πόρων μετάβασης διαπερατότητας" ή "μεγακανάλι". Στην συνέχεια, η κασπάση 9 ενεργοποιεί κασπάσες κατώτερου σταδίου οδηγώντας τελικά το κύτταρο σε θάνατο, αφού αποσυνθέτουν τον πυρήνα και τον φλοιό του κυττάρου οδηγώντας τελικά σε φαγοκυττάρωση ⁹⁰.

1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

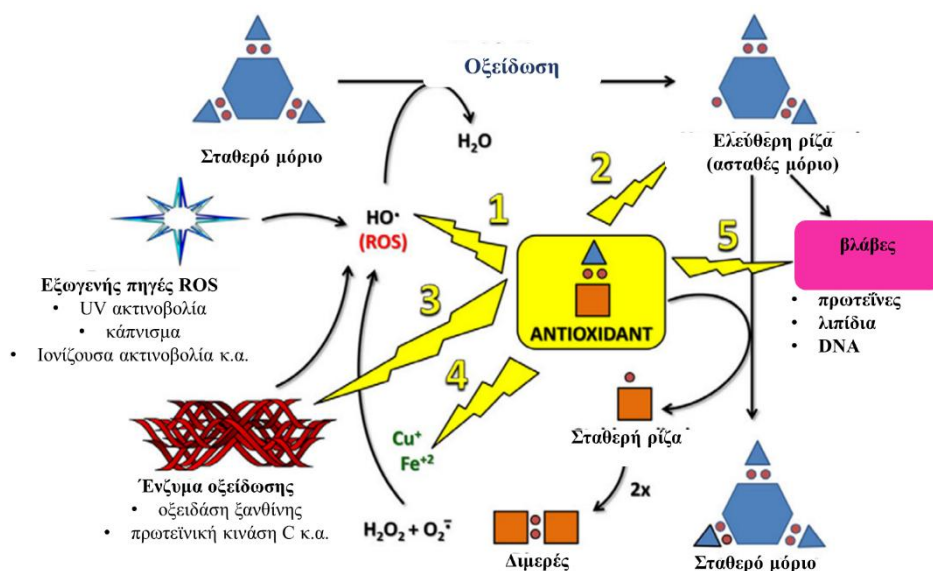
Προκειμένου να αντιμετωπίσουν οξειδωτικές βλάβες προκαλούμενες από τον σχηματισμό και τη δράση των ελευθέρων ριζών τα κύτταρα ανέπτυξαν μηχανισμούς που ονομάζονται αντιοξειδωτικοί. Πιο συγκεκριμένα ως αντιοξειδωτικό ορίζεται «οποιαδήποτε ουσία, η παρουσία της οποίας, μπορεί να καθυστερήσει, να αναστείλει

ή να απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» ⁴. Βασική προϋπόθεση για τον ορισμό μιας ουσίας ως αντιοξειδωτική να είναι γνωστοί τόσο η συγκέντρωση που απαιτείται για την επιθυμητή δράση όσο και ο τρόπος δράσης της ⁷.

1.3.2 Κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται αρχικά αναλογικά με τον μηχανισμό δράσης τους. Πιο συγκεκριμένα, εκείνα που έχουν την δυνατότητα να:

1. Εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες, παραχωρώντας τους ένα ηλεκτρόνιο
2. Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια, αφού γίνουν δότες ατόμων υδρογόνου
3. Αναστέλλουν την δράση ενζύμων που εμπλέκονται με τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (πχ οξειδάση της ξανθίνης)
4. Μείωση της βιοδιαθεσιμότητας μετάλλων μετάπτωσης όπως είναι ο σίδηρος και ο χαλκός, τα οποία έχουν την ικανότητα να δρουν προ-οξειδωτικά οδηγώντας σε σχηματισμό δραστικών μορφών μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss
5. Άμεση επιδιόρθωση βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των βασικότερων όπως είναι τα λιπίδια και το DNA ⁹¹.



Εικόνα 13. Γενικό σχήμα που απεικονίζει τους 5 κύριους μηχανισμούς με τους οποίους λειτουργεί ένα αντιοξειδωτικό ⁹¹.

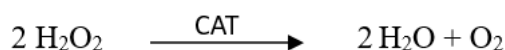
Ανάλογα με την βιολογική τους δράση τα αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά, ενώ τα μη ενζυμικά χωρίζονται σε δύο επιπλέον κατηγορίες τα ενδογενή και τα εξωγενή. Ως εξωγενή ορίζονται τα μόρια που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, ενώ ως ενδογενή ορίζονται εκείνα που συντίθενται από τον οργανισμό (ενώ κάποια από αυτά προσλαμβάνονται και από τις τροφές) τα οποία διαχωρίζονται περεταίρω σε υδρόφιλα και λιπόφιλα ⁹².

1.3.2.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

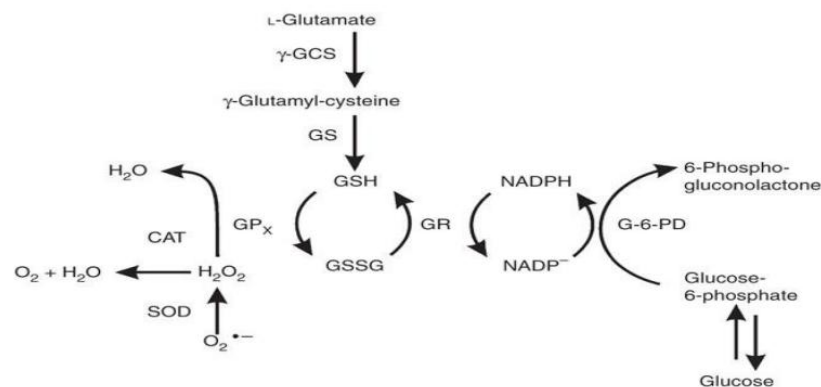
Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η καταλάση (CAT), η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ^{46,48,93}.

Πιο συγκεκριμένα, η SOD είναι πολύ σημαντική για το κύτταρο καθώς μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 το οποίο είναι λιγότερο δραστικό μόριο. Βρίσκεται σε 3 ισομορφές οι οποίες διαφέρουν αρχικά ως προς το μέταλλο του ενεργού κέντρου τους και την θέση τους στο κύτταρο. Σημαντικότερη είναι η Mn-SOD, αφού βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, ενώ η Cu-SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η CuZn-SOD, η οποία βρίσκεται στο εξωκυττάριο υγρό ⁹⁴.

Η CAT θεωρείται το σημαντικότερο ένζυμο της αντιοξειδωτικής άμυνας αφού απαντάται σε όλα τα κύτταρα, σε βασικά οργανίδια (μιτοχόνδρια και υπεροξεισώματα), ενώ συναντάται και ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα. Βασική λειτουργία της CAT είναι αποικοδόμηση της μη ρίζας του H_2O_2 σε μη δραστικά μόρια. Παρακάτω απεικονίζεται η αντίδραση που καταλύεται από την CAT ²³.



Το ένζυμο GPx μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 . Για να το πετύχει αυτό οξειδώνει την γλουταθειόνη (GSH), την οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα. Στην συνέχεια λειτουργεί η οποία χρησιμοποιώντας τη φωσφορυλιωμένη μορφή του νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτιδίου (NADPH) μετατρέπει πάλι την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) ^{95,96}.



Εικόνα 14. Απεικόνιση της δράσης των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών^{46,48,93}.

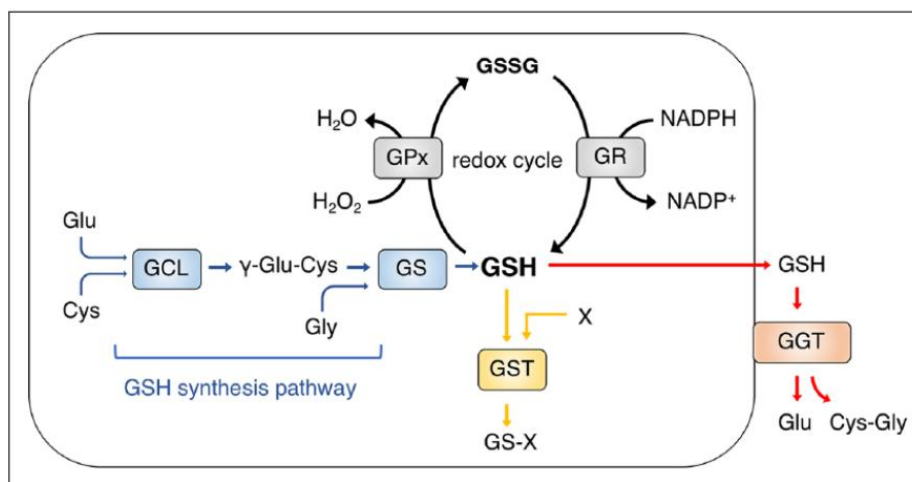
ο Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Γλουταθειόνη (GSH)

Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τρία αμινοξέα, το L-γλουταμινικό οξύ, την L-κυστεΐνη και τη γλυκίνη. Θεωρείται το πιο βασικό ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό αφού απαντάται σε μεγάλες ποσότητες και κατέχει σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου από οξειδωτικές βλάβες διατηρώντας την ομοιόσταση.

Έχει την ικανότητα μέσω της σουλφυδρυλικής ομάδας κυστεΐνης που διαθέτει να ανάγει τις ελεύθερες ρίζες⁸. Πιο συγκεκριμένα αναστέλλοντας την δράση των $\text{OH}^\bullet$, $^1\text{O}_2$ και ανάγοντας τις ρίζες τοκοφερόλης μπορεί να εμποδίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων⁹⁷. Η παρουσία της GSH σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη τόσο για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όσο και για την ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών⁹⁸. Για την βιοσύνθεση της GSH, το γλουταμινικό συνδυάζεται με την κυστεΐνη για να σχηματιστεί γ-γλουταμυλοκυστεΐνη από τη λιγάση γλουταμινικού-κυστεΐνης (GCL). Στη συνέχεια, η συνθετάση της GSH (GS) συνδέει αυτό το διπεπτίδιο με τη γλυκίνη. Η GSH χρησιμοποιείται ως συμπράγοντας για τη μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την GPx, παράγοντας την GSSG. Στη συνέχεια, η GSSG ανάγεται σε GSH από την GR χρησιμοποιώντας NADPH. Τα βήματα αυτά σχηματίζουν έναν οξειδοαναγωγικό κύκλο. Η GSH S-τρανσφεράση (GST) αποτοξινώνει τα υπεροξειδία και τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων που περιέχουν καρβονύλια χρησιμοποιώντας GSH. Η GSH μεταβολίζεται εκτός κυττάρου, μέσω της εκτο-ένζυμο γ-γλουταμυλτρανσπεπτιδάση (GGT) που μετατρέπει την GSH σε γ-γλουταμυλικό

αμινοξύ και κυστεϊνυλ-γλυκίνη ⁹⁹. Ορισμένα αμινοξέα της διατροφής μπορούν να επάγουν την σύνθεσή της ¹⁰⁰, ωστόσο μόνο το ήπαρ μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην σύνθεσή της ¹⁰¹.



Εικόνα 15. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός γλουταθειόνης ⁹⁹.

Βιταμίνη C

Είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική εξωκυττάρια και στο κυτταρόπλασμα. Εντοπίζεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στους ιστούς, και η δραστηριότητα της προκύπτει κυρίως από την ικανότητά της να σχηματίζει λιγότερο δραστικά μόρια, δίνοντας ηλεκτρόνια σε πληθώρα δραστικών μορφών (πχ $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, $\text{LOO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$), και να δεσμεύει ιόντα χαλκού τα οποία δρουν οξειδωτικά ¹⁰².

Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Είναι ένα υδρόφοβο σύμπλεγμα βιταμινών αποτελούμενων από πολλές ισομορφές που ονομάζονται τοκοφερόλες, με πιο γνωστή την α-τοκοφερόλη καθώς είναι η πιο ενεργή μορφή της και η παρούσα στη φύση σε μεγαλύτερη έκταση. Αλληλοεπιδρά απευθείας με τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και με έτερα αντιοξειδωτικά μόρια (πχ βιταμίνη C, GSH κα.) τα οποία την αναγεννούν από την οξειδωμένη της μορφή. Η βιταμίνη E είναι ιδιαίτερος σημαντική, καθώς ανακόπτει την λιπιδική υπεροξείδωση. Πιο συγκεκριμένα η δομή της της επιτρέπει να δρα έναντι των δραστικών μορφών σε λιπιδικό περιβάλλον, με πιο βασική της δράση εκείνη έναντι των

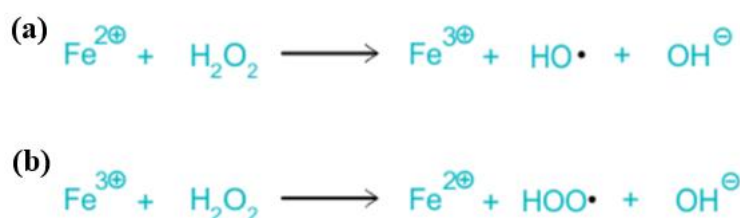
ριζών υπεροξυλίου που προκύπτουν από την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) ¹⁰³.

Ουρικό οξύ

Προκύπτει από την αποικοδόμηση των πουρινών και είναι το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο του πλάσματος και των μυών. Μετά από έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνεται η συγκέντρωση του ουρικού οξέος στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών. επίσης, το ουρικό οξύ σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου εμποδίζοντας έτσι τον Fe^{3+} να δράσει προοξειδωτικά ^{104–107}.

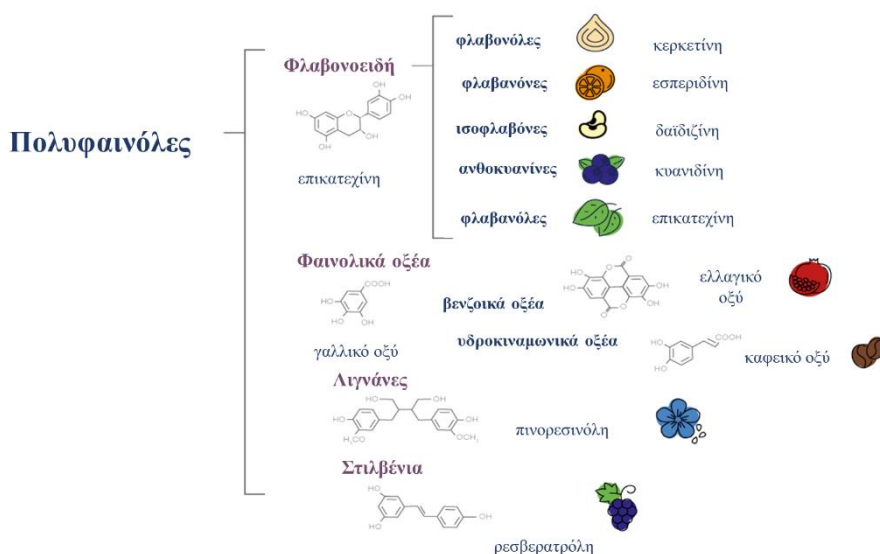
Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και συμβάλλουν στη φυσική άμυνα εναντίον βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων ¹⁰⁸. Αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα φυτοχημικών ενώσεων που εντοπίζονται στα φυτά στα οποία οφείλουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους όπως είναι το χρώμα, η γεύση, αλλά και την οξειδωτική τους σταθερότητα ¹⁰⁹. Τρόφιμα και ροφήματα φυτικής προέλευσης όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, τσάι, καφές, μέλι κ.α. θεωρούνται σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών λόγω της περιεκτικότητας τους σε πολυφαινόλες ^{110–116}. Οι πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά χαρίζοντας είτε υδρογόνο είτε ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες, ενώ χηλιώνουν και μεταπτωτικά μέταλλα μειώνοντας τις επιπτώσεις της αντίδρασης Fenton. Η αντίδραση Fenton σχηματίζει σημαντικές λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους ρίζες υπεροξυλίου και υπεροξυλίου ^{117,118}.



Εικόνα 16. Αντίδραση (a) Haber-Weiss και (b) Fenton ^{117,118}.

Στα φυτά έχουν βρεθεί παραπάνω από 8000 πολυφαινολικές ενώσεις που προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλλανίνη. Κατά βάση βρίσκονται συζευγμένα με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα σακχάρου συνδεδεμένα με υδροξυλομάδες, ωστόσο υπάρχουν και άμεσοι δεσμοί μεταξύ σακχάρων και ατόμων άνθρακα. Ταξινομούνται αναλογικά του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων τους, αλλά και βάσει των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους ¹¹⁹.



Εικόνα 17. Κατηγοριοποίηση πολυφαινολών ¹¹⁹.

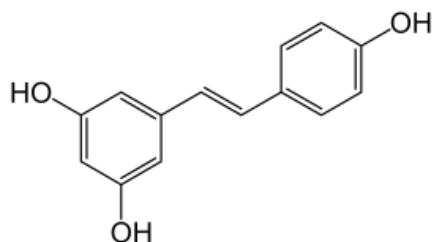
ο Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Διαθέτουν φαινολικό τμήμα και σταθεροποιημένη δομή συντονισμού, η οποία προκαλεί τη δωρεά του ατόμου υδρογόνου ή ηλεκτρονίου. Τα φαινολικά οξέα διαθέτουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τις γνωστές αντιοξειδωτικές βιταμίνες σε *in vitro* συστήματα. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα συναντώνται πιο συχνά με πιο κοινά το φερουλικό, το καφεϊκό και το p-κουμαρικό ^{119,120}.

ο Στυλβένια

Τα στυλβένια συντίθενται στα φυτά ως μηχανισμός άμυνας έναντι εξωτερικών καταπονήσεων, όπως μόλυνση από παθογόνα και υπερϊώδη ακτινοβολία. Είναι φυσικές φαινολικές ενώσεις που απαντώνται σε διάφορα είδη φυτών και έχουν αντιοξειδωτική

δράση. Χαρακτηρίζονται από έναν άνθρακα 1,2-διφαινυλαιθυλενίου (C6-C2-C6), που αποτελείται από ένα τμήμα αιθυλενίου στη μέση δύο δακτυλίων βενζολίου. Η

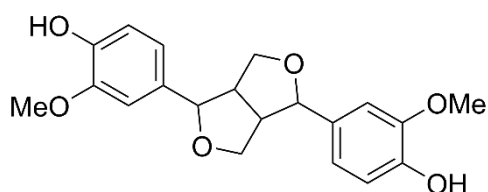


ρεσβερατρόλη είναι το πιο εκτενώς μελετημένο στιλβένιο λόγω του ευρέος φάσματος βιολογικών δραστηριοτήτων του ^{121,122}.

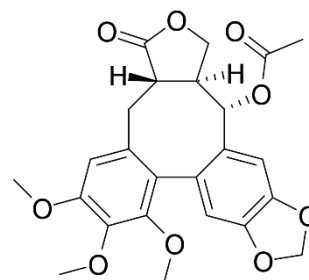
Εικόνα 18. Ρεσβερατρόλη ^{121,122}.

ο Λιγνάνες

Οι λιγνάνες είναι φαινολικά διμερή με δομή 2,3-διβενζυλοβουτανίου. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστό ότι υπάρχουν ως δευτερεύοντα συστατικά πολλών φυτών, όπου αποτελούν τα δομικά στοιχεία για το σχηματισμό της λιγνίνης στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Οι ενώσεις εμφανίζονται κυρίως στη γλυκοζιτική μορφή. Χαρακτηριστικό της κατηγορίας αυτής είναι η σύνδεση δυο φαινυλπροπανικών μορίων ¹²³.



Εικόνα 20. Πινορεσινόλη



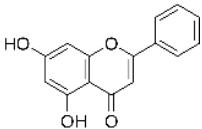
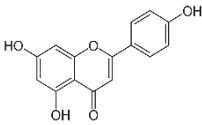
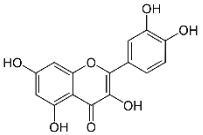
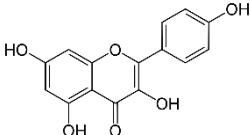
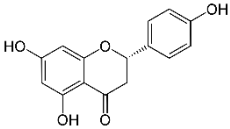
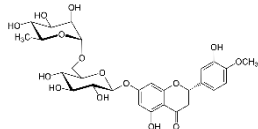
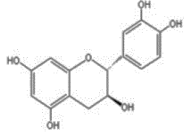
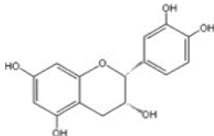
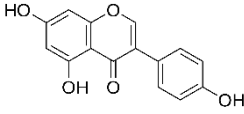
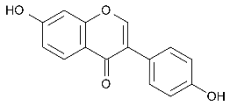
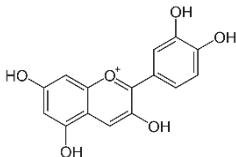
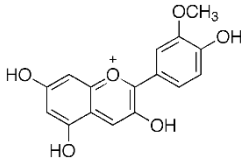
Εικόνα 19. Στεγανασίνη

ο Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από έναν δακτύλιο βενζοπυρόνης που φέρει φαινολικές ή πολυφαινολικές ομάδες σε διάφορες θέσεις. Βρίσκονται συχνότερα σε φρούτα, βότανα, δημητριακά, ξηρούς καρπούς, λαχανικά, άνθη και σπόρους. Η παρουσία βιοδραστικών φυτοχημικών συστατικών που υπάρχουν σε αυτά τα διάφορα μέρη των φυτών τους προσδίδει τη φαρμακευτική τους αξία και την βιολογική τους δράση. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 10.000 φλαβονοειδείς ενώσεις. Συντίθενται φυσικά μέσω της οδού των φαινυλοπροπανοειδών με βιοδραστικότητα που εξαρτάται

από το μηχανισμό απορρόφησης και τη βιοδιαθεσιμότητά τους ¹²⁴. Διαχωρίζονται επιμέρους σε:

Πίνακας 2. Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών

Κατηγορία Φλαβονοειδών	Βασικά μόρια της κατηγορίας	
Φλαβόνες	Χρυσίνη 	Απιγενίνη 
Φλαβονόλες	Κερκετίνη 	Καμφερόλη 
Φλαβανόνες	Ναριγκενίνη 	Εσπεριδίνη 
Φλαβανόλες	Κατεχίνη 	Επικατεχίνη 
Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη 	Δαϊδίζινη 
Ανθοκυανίνες	Κυανιδίνη 	Πεονιδίνη 

1.4 Αντιοξειδωτικό παράδοξο

Περιγράφεται ως το φαινόμενο κατά το οποίο οι δραστικές μορφές συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις και η κατανάλωση υψηλών δόσεων διατροφικών αντιοξειδωτικών δεν έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα (κατά περίπτωση χαμηλή ή καθόλου αποτελεσματικότητα). Αυτό μπορεί να οφείλεται αρχικά στον ρόλο που διαδραματίζουν οι δραστικές μορφές στην εξέλιξη των παθολογικών καταστάσεων, αφού η συνεισφορά τους δεν είναι ξεκάθαρη. Έπειτα, μπορεί να οφείλεται στους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο και αλληλοεξαρτώμενο σύστημα, το οποίο συνολικά μπορεί να μην ανταποκρίνεται σε υψηλές δόσεις διατροφικών αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα η ένταση της βλάβης στα βιομόρια να μην περιορίζεται σημαντικά ¹²⁵. Τέλος, μπορεί να ευθύνεται η ίδια η δόση καθώς χαμηλότερες δόσεις ή/και μίγματα αντιοξειδωτικών μπορεί να επιφέρουν πιο θετικά αποτελέσματα συγκριτικά με υψηλές δόσεις απλούστερων ενώσεων ¹²⁵⁻¹²⁹. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι στην παχυσαρκία, η οποία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης, η κανονικοποίηση των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης του πλάσματος στα φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να έχει υψηλότερη "αντιοξειδωτική δράση" από τη χρήση υψηλότερων δόσεων αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων ^{126,130-134}. Σε αυτή την κατεύθυνση, ενδιαφέρουσα θα ήταν η διερεύνηση κι ο προσδιορισμός ενός μεγάλου φάσματος δόσεων (κυρίως χαμηλών) ώστε να αποκαλυφθούν τυχόν ευεργετικές ιδιότητες φυσικών προϊόντων ευρείας κατανάλωσης.

1.5 Το μέλι

Ως μέλι ορίζεται η φυσική γλυκιά ουσία παραγόμενη από μέλισσες του είδους *Apis mellifera*, και προκύπτει από τη συλλογή του νέκταρ από άνθη ή από εκκρίσεις φυτών ή/και μικρών εντόμων που ονομάζονται μελιτώματα. Αφού συλλέξουν το νέκταρ ή/και τα μελιτώματα οι μέλισσες επεξεργάζονται το μίγμα, απομακρύνουν την υγρασία και τελικά το αποθηκεύουν και το φυλάσσουν στην κυψέλη προκειμένου να ωριμάσει (European Commission, 2002-Οδηγία 2001/110/EK).

1.5.1 Η ιστορία της μελισσοκομίας

Εκτιμάται ότι η μέλισσα έχει παρουσία στη γη για περισσότερα από 15 εκατομμύρια χρόνια ¹³⁵. Λόγω της επικονίασης και γονιμοποίησης τόσο καλλιεργούμενων όσο και αυτοφυών φυτών θεωρείται ζωτικής σημασίας για το οικοσύστημα και την οικονομία. Αναγνωρίζοντας την δυναμική της μέλισσας και των προϊόντων που παράγει, αρχαίοι πολιτισμοί άρχισαν να αναπτύσσουν τεχνικές για την εκμετάλλευσή τους. Σπηλαιογραφία που χρονολογείται από το 8000 έως το 6000 π.Χ. ανακαλύφθηκε στο Cueva de la Araña της Ισπανίας απεικονίζοντας έναν άνθρωπο της Μεσολιθικής περιόδου να συλλέγει μέλι ¹³⁶. Περί το 2450 π.Χ. στο ναό του Ήλιου του Φαραώ σχεδιάστηκε ανάγλυφο που απεικονίζει μελισσοκόμους να εκτελούν πρώιμης τεχνικής μελισσοκομικές εργασίες ¹³⁷. Οι πρώτες κυψέλες που σχεδιάστηκαν ήταν οριζόντιες και χρονολογούνται περί το 875 π.Χ. στο σύγχρονο Ισραήλ. Σε αυτές τις κυψέλες βρέθηκαν υπολείμματα κορμού και τμήμα φτερών μελισσών της φυλής *Apis mellifera anatoliaca* ¹³⁸. Οι πρώτες αυτές οριζόντιες κυψέλες χρησιμοποιήθηκαν από πολλούς λαούς, με πρώτη ύλη οποιοδήποτε υλικό υπήρχε διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες στην περιοχή, παραδείγματα των οποίων αποτελούν ο πηλός και η λάσπη. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι οι πρώτες κυψέλες χρησιμοποιήθηκαν μετά το 400 π.Χ. ¹³⁹. Στο βιβλίο του Αριστοτέλη (384-322 π.Χ.), «Για τη Βιολογία» υπάρχουν αρκετές καταγραφές για την κοινωνία των μελισσών. Στην περίοδο αυτή υπολογίζεται ότι έγινε για πρώτη φορά η



Εικόνα 21. Πρώιμη ανάστομη κυψέλη κινητής κηρήθρας από τα Κύθηρα.

χρήση κινητών πλαισίων αφού στην Αττική και σε ορισμένα νησιά εντοπίστηκαν όρθια πήλινα δοχεία. Η πρώτη ξύλινη κυψέλη με κινητά πλαίσια κατασκευάστηκε από τον ‘πατέρα’ της μελισσοκομίας, Stefano Della Rocca το 1780, ωστόσο είναι αρκετοί εκείνοι που διεκδικούν την πρωτιά για την εφεύρεση αυτή. Οι μελισσοκόμοι στην Ελλάδα προήγαγαν κυρίως την διευκόλυνση αναφορικά με την πρόσβαση στην κυψέλη οδηγώντας στην κατασκευή μεγάλων πήλινων κατασκευών. Η εκθετική πρόοδος της μελισσοκομίας προήγαγε τη μακροζωία των μελισσοσμηνών, γεγονός που ωφελεί τον μελισσοκόμο και την παραγωγή του ¹⁴⁰. Στη σύγχρονη μελισσοκομία υπάρχουν διάφοροι τύποι κυψέλης και εξελιγμένα συστήματα αναφορικά με την συλλογή του μελιού ¹⁴¹, ωστόσο έχουν επικρατήσει 2 τύποι κυψελών, η Dadant και η Langstroth ¹⁴². Η μέγιστη χωρητικότητα της κυψέλης Dadant είναι τα 10 πλαίσια και είναι περισσότερο διαδεδομένη στην Αμερική ¹⁴³. Η κυψέλη Langstroth είναι περισσότερο διαδεδομένη στην Ελλάδα, στην οποία εμφανίστηκε στα μέσα του 20^{ου} αιώνα και έγινε γνωστή λόγω της εύκολης μεταφοράς και χειρισμού της ¹⁴⁴.

1.5.2 Η μέλισσα και η συμπεριφορά στην κοινωνία της

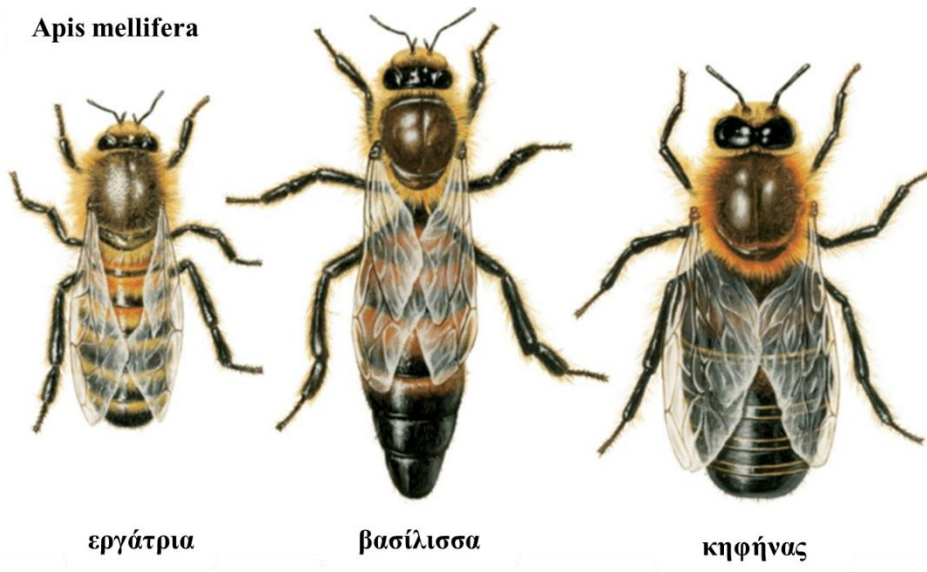
Έχουν ταξινομηθεί περίπου 1.000.000 είδη εντόμων ανά τον κόσμο ¹⁴⁵, με τις μέλισσες να ανέρχονται στο 20% περίπου του συνόλου της κατηγορίας (usgs.gov) Οι μέλισσες είναι ένας από τους πιο εξαρτημένους από το οικοσύστημα πληθυσμούς, αφού τρέφεται με γύρη και νέκταρ μετατρέποντας τα σε διάφορα άλλα προϊόντα σημαντικά τόσο για την διαβίωση τους, όσο και για τον άνθρωπο, γεγονός που τις καθιστά αντικείμενο ενδιαφέροντος για την επιστήμη. Οι μέλισσες έχουν προσαρμοστεί και εξελιχθεί χτίζοντας μια αλληλοεξαρτώμενη σχέση με το οικοσύστημα λόγω της επικοινωνίας ¹⁴⁶.

Πίνακας 3. Κατάταξη της μέλισσας Linnaeus, 1758

Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Συνομοταξία	Αρθρόποδα (Arthropoda)
Ομοταξία	Έντομα (Insecta)
Τάξη	Υμενόπτερα (Hymenoptera)
Οικογένεια	Απίδες (Apidae)
Γένος	Μέλισσα (Apis)
Είδος	Μέλισσα η μελιτοφόρος (Apis mellifera)

Η παρουσία της μέλισσας στη γη υπολογίζεται περίπου στα 30 εκατομμύρια χρόνια, έχοντας εξελιχθεί ανά τα χρόνια αφού κατάφεραν να προσαρμοστούν σε αλλαγές που υπέστησαν τα ανθοφόρα φυτά που αποτελούν τη βασική πηγή τροφής τους. Στην κοινότητα Apis υπάρχουν διάφορα μελιτοφόρα είδη μελισσών όπως οι cerana, florea, mellifera κ.α.. Ωστόσο στην Ελλάδα και γενικότερα στην δυτική Ευρώπη συναντάμε την Apis mellifera ^{147,148}.

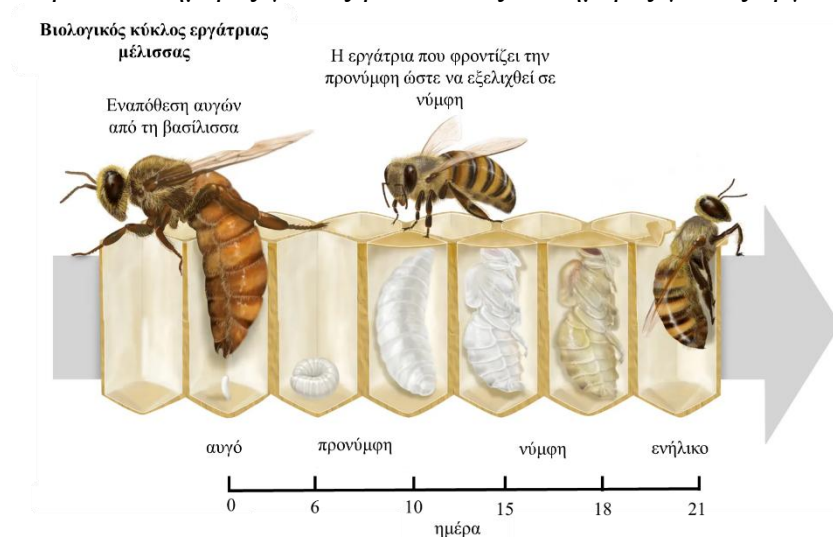
Τα έντομα του είδους Apis mellifera είναι κόκκινα/καφέ με μαύρες λωρίδες και πορτοκαλοκίτρινους δακτυλίους στην κοιλιά. Τα πόδια τους έχουν χρώμα σκούρο καφέ έως μαύρο, με ένα καλάθι στο πίσω ζευγάρι τους το οποίο χρησιμοποιούν για την συλλογή γύρης. Τα ενήλικα διαχωρίζονται σε αρσενικά που ονομάζονται κηφήνες και σε θηλυκά που διαχωρίζονται επιμέρους σε εργάτριες και βασίλισσες. Οι εργάτριες είναι μικρότερες σε μέγεθος από τις βασίλισσες. Η βασική διαφορά μεταξύ εργάτριας και βασίλισσας είναι ότι η εργάτρια κατά κανόνα δεν γεννάει. Ειδικότερα, στην περίπτωση που το μελίσσι μείνει για κάποιο λόγο χωρίς βασίλισσα οι εργάτριες γεννούν αυγά, τα οποία ωστόσο είναι αγονιμοποίητα, γεννούν δηλαδή μόνο αρσενικά. Στην περίπτωση που η βασίλισσα δεν αντικατασταθεί το μελίσσι γίνεται αρρενοτόκο καταλήγοντας να είναι μη βιώσιμο. Η ενήλικη θηλυκή μέλισσα διαθέτει 9 κοιλιακά τμήματα εκ των οποίων τα 3 διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν το κεντρί. Το κεντρί συνδέεται με τον δηλητήριο σάκο και αποτελείται από πριονωτές προεξοχές στο άκρο της κοιλιάς. Είναι ένα αιχμηρό όργανο που χρησιμοποιείται για άμυνα. Επειδή το κεντρί είναι οδοντωτό, οι εργάτριες μέλισσες αποσύρουν το κεντρί αφού τσιμπήσουν κάποιον άλλον οργανισμό. Η βασίλισσα διαθέτει κεντρί, ωστόσο δεν το χρησιμοποιεί ^{146,149}. Οι κηφήνες είναι πιο μικρόσωμοι από τις βασίλισσες, ενώ έχουν μικρότερα σε μήκος φτερά και από τις εργάτριες μέλισσες ¹⁵⁰⁻¹⁵².



Εικόνα 22. *Apis mellifera*. Κατηγοριοποίηση ανά φύλο και κάστα

Οι βασίλισσες αντικαθίστανται μετά από 1-2 χρόνια σε μια εμπορική κυψέλη (για λόγους παραγωγικότητας) ωστόσο έχουν διάρκεια ζωής ως ενήλικες 2-5 χρόνια, ενώ η μεγαλύτερη καταγεγραμμένη διάρκεια ζωής για μια βασίλισσα μελισσών είναι 8 χρόνια ¹⁵³. Οι εργάτριες αναπτύσσονται πλήρως εντός 21 ημερών και η διάρκεια ζωής τους ποικίλλει ανάλογα με την εποχή. Το καλοκαίρι ζουν κατά μέσο όρο 15-38 ημέρες, την άνοιξη και το φθινόπωρο 30-60 ημέρες και έως 150 ημέρες το χειμώνα ¹⁵⁴. Οι κηφήνες ζούνε για 4 με 8 εβδομάδες, εκτός από τους χειμερινούς μήνες όπου και εκλείπουν ¹⁵⁵. Σε κάθε κυψέλη υπάρχει μόνο μία βασίλισσα ικανή για αναπαραγωγή, αφού οι εργάτριες μέλισσες είναι ικανές να γεννούν μόνο αγονιμοποίητους απογόνους, δηλαδή κηφήνες. Σε περιόδους με ήπιες καιρικές συνθήκες, οι κηφήνες αποχωρούν από την κυψέλη προς περιοχές περιμετρικά της κυψέλης που ονομάζονται "περιοχές συγκέντρωσης κηφήνων", ώστε να είναι εύκολο για τις βασίλισσες να τους εντοπίσουν. Οι βασίλισσες πετούν σε αυτά τα σημεία, ελκύοντας τους κηφήνες εκκρίνοντας φερομόνες. Οι κηφήνες επιδιώκουν το ζευγάρωμα εν πτήσει. Σκοπός του κηφήνα είναι να ζευγαρώσει, οπότε περιφέρεται μέχρι να το καταφέρει. Κάθε έντομο που καταφέρνει να ζευγαρώσει πεθαίνει τις επόμενες ώρες, ή πεθαίνουν προσπαθώντας. Οι βασίλισσες μπορούν να ζευγαρώσουν με κηφήνες της δικής τους κυψέλης ή από κάποια γειτονική. Η βασίλισσα κάνει έως 6 πτήσεις για ζευγάρωμα στην αρχή της ζωής της (ζευγαρώνει με έως 10 κηφήνες/πτήση), διατηρώντας το σπέρμα που έχει συλλέξει μέχρι το τέλος της ζωής της ^{146,155,156}.

Οι μέλισσες είναι ολομεταβολικά έντομα, με τον βιολογικό τους κύκλο να αποτελείται από 4 στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικο. Ανάλογα με την θερμοκρασία, τα αυγά εκκολάπτονται σε περίπου 3 ημέρες ¹⁵⁷. Η λευκή προνύμφη που προκύπτει από το αυγό παραμένει στο κελί της, όπου αναπτύσσεται, τρέφεται και περιποιείται από ενήλικες μέλισσες. Η τροφή που λαμβάνει μια γονιμοποιημένη προνύμφη καθορίζει αν θα γίνει βασίλισσα ή εργάτρια. Σε θερμοκρασία περίπου 34°C, οι εργάτριες ολοκληρώνουν το στάδιο της προνύμφης σε 4-5 ημέρες, οι βασίλισσες σε 6 και τα αρσενικά σε 6 με 7 ημέρες. Με το πέρας της περιόδου αυτής οι ενήλικες εργάτριες σφραγίζουν το κελί τους με την προνύμφη να μεταλλάσσεται. Πιο συγκεκριμένα υφαίνει ένα μεταξωτό κουκούλι, οδεύοντας στο στάδιο της νύμφης. Η εξέλιξη σε νύμφη διαρκεί 7-8 ημέρες για τις βασίλισσες, 12 ημέρες για τις εργάτριες και 14-15 ημέρες



Εικόνα 23. Βιολογικός κύκλος εργάτριας μέλισσας ⁴¹⁰.

για τους κηφήνες.

Για την έξοδό τους μασούν το κελί και ζουν ως εργάτριες για 2-4 εβδομάδες εάν γεννηθούν

καλοκαίρι, και έως 5 μήνες αν εκκολαφθούν τον χειμώνα ¹⁵⁴. Οι κηφήνες δεν

επιβιώνουν τον χειμώνα. Οι βασίλισσες χρειάζονται συνήθως 16 ημέρες για έναν πλήρη βιολογικό κύκλο, οι εργάτριες 21 ημέρες και ο κηφήνας 24 ^{156,158}.

Οι ευρωπαϊκές μέλισσες ζουν οργανωμένες σε κοινωνίες όπου οι εργάτριες μέλισσες είναι η πολυπληθέστερη ομάδα της κυψέλης και εκτελούν όλες τις απαραίτητες για την διαβίωση εργασίες, ενώ οι κηφήνες με την βασίλισσα ασχολούνται μόνο με την αναπαραγωγή. Η συμπεριφορά των εργατριών μεταβάλλεται καθώς γερνάνε. Οι αρμοδιότητες των νεαρών εργατριών περιλαμβάνει τον καθαρισμό των κελιών, ενώ λίγες μέρες αργότερα μετατίθενται σε πόστα που ασχολούνται με την συντήρηση της κυψέλης και εργασίες που μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν την διατήρηση της κυκλοφορίας του αέρα και της θερμοκρασίας, και την επεξεργασία του

νέκταρ που φέρνουν στην κυψέλη οι συλλέκτριες μέλισσες. Αφού φτάσουν στην 2^η εβδομάδα της ζωής τους, αποκτούν την ικανότητα να παράγουν κερί, βοηθώντας έτσι στην κατασκευή και επισκευή της κυψέλης σε συνδυασμό με τις προηγούμενες εργασίες τους. Κατά την 3^η εβδομάδα, οι αδένες τροφής και κεριού ατροφούν οπότε μετατάσσονται σε καθήκοντα αναζήτησης τροφής, γίνονται δηλαδή συλλέκτριες. Ωστόσο, μεταξύ των 12 και των 25 ημερών της ζωής τους ορισμένες εργάτριες εκτελούν χρέη φύλαξης και προστασίας της κυψέλης από πιθανούς εισβολείς.

Μια σημαντική περίοδος για την κυψέλη είναι αυτή της σμηνουργίας. Πιο συγκεκριμένα ως σμηνουργία ορίζεται η συμπεριφορά σε μια κυψέλη όταν σε αυτή γεννιέται η βασίλισσα που θα πάρει την θέση της προηγούμενης. Η παλαιά βασίλισσα παίρνει μαζί της και κάποιες εργάτριες μέλισσες. Οι εργάτριες που σμηνουργούν, στέλνουν τις ανιχνεύτριες εργάτριες προς αναζήτηση νέας κατοικίας. Η σμηνουργία είναι μια προσωρινή κατάσταση και συμβαίνει σε οποιοδήποτε μέρος μπορούν να χρησιμοποιήσουν οι μέλισσες για προσωρινή φωλιά ^{143,156}.

Οι εργάτριες μέλισσες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις αρμοδιότητες που φέρουν εις πέρας στην κυψέλη. Οι κατηγορίες είναι ως εξής:

- Καθαρίστρια: οι πολύ νεαρές καθαρίστριες μέλισσες ετοιμάζουν τα κελιά για την ωοτοκία της βασίλισσας. Οι μεγαλύτερες ηλικιακά μέλισσες της κατηγορίας απομακρύνουν υπολείμματα όπως είναι οι κόκκοι γύρης και τα τμήματα μελισσών καθώς και τις ακαθαρσίες των νυμφών που έχουν εκκολαφθεί.
- Τροφός: οι μέλισσες της κατηγορίας αυτής είναι συνήθως 6 ημερών. Υποχρέωση τους είναι η διατροφή των γόνων. Λαμβάνουν χημικά και μηχανικά μηνύματα από τους γόνους που τις βοηθούν να καταλάβουν την ηλικία τους και να τις ταΐσουν σε ανάλογες ποσότητες.
- Αρχιτέκτων: έχουν ηλικία 1-50 ημερών και παράγουν κερί το οποίο χρησιμοποιούν για την κατασκευή των κελιών. Ανάλογα με την ηλικία τους έχουν διαφορετικές αρμοδιότητες που περιλαμβάνουν τόσο την κατασκευή κελιών από την αρχή όσο και την επισκευή αυτών όπου χρειάζεται.
- Αποθηκάριος: η ομάδα αυτή αποτελείται από μέλισσες περίπου 15 ημερών των οποίων η δουλειά είναι να παραλαμβάνουν το φορτίο (μίγμα με βάση το νέκταρ

ή/και το μελίτωμα) της συλλέκτριας μέλισσας, να το επεξεργάζονται περαιτέρω και να το τοποθετούν στην κυψέλη.

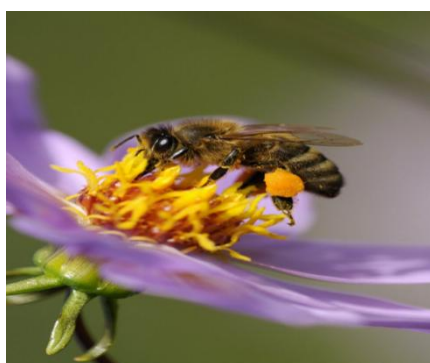
- **Αερίστρια:** ο μέσος όρος ηλικίας τους είναι οι 18 ημέρες, ωστόσο οι αερίστριες μπορούν να είναι οποιασδήποτε ηλικίας. Οι αερίστριες μέλισσες ρυθμίζουν το μικροκλίμα της κυψέλης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν τα φτερά τους ώστε να δημιουργήσουν ρεύμα αέρα, ρυθμίζοντας έτσι την θερμοκρασία, την υγρασία και τα επίπεδα CO₂ της κυψέλης. Η αερίστρια είναι ιδιαίτερα σημαντική αφού πρέπει να εξασφαλίσει την εξάτμιση της περίσσειας υγρασίας.
- **Φρουρός:** κατέχουν σημαντικό ρόλο για την ασφάλεια της κυψέλης τόσο από εχθρούς, όσο και από το να εισέλθει κάποια μέλισσα που δεν ανήκει στην αποικία τους. Αφορά μέλισσες ηλικίας 12-25 ημερών.
- **Συλλέκτρια:** στην κατηγορία αυτή ανήκουν μέλισσες ηλικίας τουλάχιστον 21 ημερών. Πριν γίνει συλλέκτρια, η μέλισσα αυτή εκτελεί πτήσεις προσανατολισμού κατά την διάρκεια των οποίων χαρτογραφεί το περιβάλλον γύρω από την κυψέλη, μαθαίνοντας σημεία αναφοράς των περιοχών που επισκέφθηκε. Η διάρκεια ζωής της συλλέκτριας εξαρτάται από τις αποστάσεις που διανύει εκτός κυψέλης καθώς από τις πτήσεις καταστρέφονται τα φτερά της. Η διάρκεια ζωής της από την ανάληψη των καθηκόντων της διαρκεί 4-5 ημέρες. Μια συλλέκτρια μέλισσα πραγματοποιεί κατά μέσο όρο 10 πτήσεις ημερησίως, αριθμός που διαφοροποιείται αναλόγως της απόστασης των φυτών που έχει επιλέξει από την κυψέλη. Συνολικά σε μια αποικία είναι πιθανό να συλλεχθούν μέχρι και 5 κιλά νέκταρ ημερησίως. Εκτός του νέκταρ, η συλλέκτρια όταν επισκέπτεται άνθη ξύνοντας τους ανθήρες μαζεύει και γύρη χρησιμοποιώντας τα πόδια της με τα οποία δημιουργεί σβόλο γύρης στην εξωτερική πλευρά του ποδιού της. Είναι σύνηθες οι συλλέκτριες να ειδικεύονται είτε στην συλλογή νέκταρ είτε στην συλλογή γύρης, ωστόσο υπάρχουν και εκείνες που συλλέγουν και τα δύο (μικτές). Σε μια διαδρομή μπορούν να συλλεχθούν 10-30 mg γύρης.

Όλες οι παραπάνω κατηγορίες αναφέρονται στις καλοκαιρινές εργάτριες. Η χειμερινή εργάτρια γεννιέται μετά το καλοκαίρι και έως τον Νοέμβριο. Διασφαλίζουν την επιβίωση της αποικίας κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ η φυσιολογία τους διαφέρει σημαντικά από τις εαρινές εργάτριες. Διαθέτουν λίπος στο κεφάλι και την κοιλιά τα οποία είναι σημαντική πηγή ενέργειας, και παχύ ανεπτυγμένο σώμα ^{143,159}.

1.5.3 Προϊόντα της κυψέλης

Τα φυσικά προϊόντα που παράγονται στην κυψέλη, όπως το μέλι, η πρόπολη, η γύρη, ο βασιλικός πολτός, το κερί και το δηλητήριο των μελισσών χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο λόγω των θετικών στην υγεία επιπτώσεων από την αρχαιότητα. Σήμερα, τα προϊόντα αυτά τυγχάνουν σημαντικού ενδιαφέροντος ως θεραπευτικά προϊόντα, καλλυντικά και εναλλακτικά φάρμακα αφού περιλαμβάνουν ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι το μέλι περιέχει την αντιβακτηριακή μεθυλογλυοξάλη καθώς και ανοσοτροποποιητικές πρωτεΐνες και φαινόλες με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Ανοσοτροποποιητικές πρωτεΐνες βρίσκονται επίσης στον βασιλικό πολτό μαζί με αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά πεπτίδια και υδροξυ-δεκανοϊκά οξέα με αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, νευροτροποποιητικές, ανοσοτροποποιητικές και αντιγηραντικές ιδιότητες. Η πρόπολη έχει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές φαινόλες, αντιμικροβιακά τερπένια και παράγωγα καφεϊκού οξέος με αντιική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση. Τα πεπτίδια του δηλητηρίου της μέλισσας έχουν αντιαθηροσκληρωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιεκφυλιστικές ιδιότητες, ενώ το ένζυμο φωσφολιπάση A2 παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση ¹⁶⁰⁻¹⁶³.

ο Γύρη



Εικόνα 24. Εργάτρια μέλισσα που έχει συλλέξει γύρη και την έχει αποθηκεύσει προσωρινά στο καλάθι γύρης.

Η γύρη είναι μια αρκετά μικρή δομή κοκκώδους μορφής, η οποία συλλέγεται από τις εργάτριες μέλισσες κατά την επίσκεψή τους σε αγγειόσπερμα φυτά. Πιο συγκεκριμένα οι μέλισσες χρησιμοποιώντας το ασθενές ηλεκτροστατικό πεδίο που δημιουργείται μεταξύ του άνθους (αρνητικά φορτισμένο) και του σώματος τους (θετικά φορτισμένο) συλλέγουν από τον ανθήρα του στήμονα σημαντικές ποσότητες γύρης ^{164,165}. Η γύρη συγκολλάτε σε τρίχες που βρίσκονται στα πίσω πόδια των μελισσών, σημείο το οποίο υγραίνεται τόσο με σιελογόνες εκκρίσεις

όσο και με νέκταρ ώστε να σχηματισθεί σφαιρίδιο (μεγέθους 1,4-4 mm). Εν συνεχεία, τα σφαιρίδια αυτά αποθηκεύονται στο λεγόμενο καλάθι γύρης που βρίσκεται στα πίσω πόδια τους μέχρι την οριστική αποθήκευσή τους στην κυψέλη. Μια μέση αποικία συλλέγει ημερησίως 50-250 g γύρης ¹⁶⁶. Με την κατανάλωση της γύρης οι μέλισσες καλύπτουν τις ανάγκες τους σε πρωτεΐνες ¹⁶⁷. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε λιπίδια, πρωτεΐνες και μικροθρεπτικά συστατικά η γύρη έχει αρχίσει να αξιοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων αφού πέραν των απαραίτητων για την διαβίωση της μέλισσας συστατικών παρουσιάζει μια μεγάλη δυναμική και για τον άνθρωπο αφού έχει αναγνωριστεί για τις εξαιρετικές διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητές της και σήμερα, καταναλώνεται εμπορικά ως συμπλήρωμα διατροφής ^{168,169}. Η γύρη των μελισσών περιέχει υδατάνθρακες (13-55%), πρωτεΐνες (10-40%), λιπίδια (1-13%), ακατέργαστες ίνες (0,3-20%) και τέφρα (2-6%) ¹⁷⁰. Στην σύστασή της επίσης παρουσιάζονται όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και λιπαρά οξέα, ελεύθερα αμινοξέα, βιταμίνες (κυρίως του συμπλέγματος Β), βασικά μέταλλα, καροτενοειδή και φλαβονοειδή ^{169,171-173}. Σε ποσοστό που ξεπερνάει το 90% των σακχάρων αποτελείται από φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη, ενώ το υπολειπόμενο ποσοστό συμπληρώνεται από σάκχαρα όπως η αραβινόζη, ισομαλτόζη, μελιβιόζη, μελεξιτόζη, ριβόζη, τρεχαλόζη και τουρανόζη ^{174,175}.

Η χρήση της γύρης που προέρχεται από τις μέλισσες τοποθετείται στους προϊστορικούς χρόνους, ενώ σήμερα έχει «κερδίσει έδαφος» λόγω της αποδεδειγμένης συμβολής της στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η προστατίτιδα και οι μικροβιακές και ανοσολογικές παθήσεις. Γνωστή είναι και η αντιοξειδωτική δράση της γύρης, αφού στην σύνθεσή της περιέχει φλαβονοειδή όπως η απιγενίνη, η επικατεχίνη η κατεχίνη, η καμφερόλη, η λουτεολίνη, η κερκετίνη, η ναρινγενίνη κ.λπ. και τα φαινολικά οξέα όπως το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το συριγγικό οξύ, και το p-κουμαρικό οξύ. Η μεγάλη αυτή ποικιλία σε ενώσεις οφείλεται κυρίως στην διαφορετική βιοποικιλότητα κάθε περιοχής ^{176,177}.

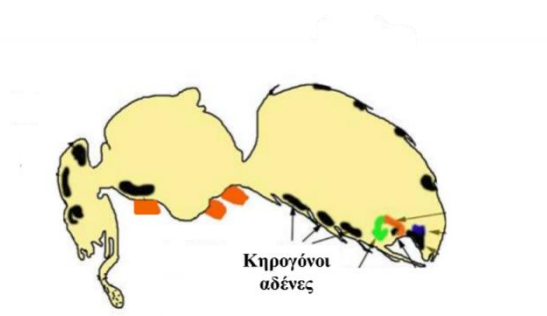
- ο Πρόπολη

Συγκεκριμένα, η πρόπολη προέρχεται από μια ρητίνη που βρίσκεται κυρίως στους οφθαλμούς και το φλοιό των κωνοφόρων. Οι συλλέκτριες μέλισσες συλλέγουν αυτές τις ρητίνες λαμβάνοντας ένα μείγμα ρητινώδους ουσίας, γύρης, κεριών και ενζύμων^{162,178}. Η ακατέργαστη πρόπολη είναι ένα κολλώδες μίγμα θεωρητικά ζωικής προέλευσης αφού προτού ενσωματωθεί στην κυψέλη, υπόκειται σε επεξεργασία κυρίως από το πεπτικό σύστημα της μέλισσας και κατά κύριο λόγο από το σάλιο. Η σύσταση της πρόπολης (παρουσία συστατικών) συνδέεται κατά βάση με την βοτανική προέλευση της, ωστόσο η συνολική ποσοστιαία σύνθεση της δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Αποτελείται από φυτικές ρητίνες (45-55%), κερί (8-35%), αιθέρια έλαια (5-10%), λιπαρά οξέα, γύρη, οργανικές και ανόργανες ουσίες. Οι οργανικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί στην πρόπολη είναι: πολυφαινόλες, τερπένια, εστέρες, αμινοξέα, βιταμίνες, μέταλλα και σάκχαρα^{162,179,180}.

Η κύρια χρήση της στην κυψέλη είναι η προστασία από αρπακτικά αφού χρησιμοποιείται ως οικοδομικό υλικό σφραγίζοντας ρήγματα, διατηρώντας έτσι την ομοιόσταση, μειώνοντας τους κραδασμούς, διατηρώντας τη ροή του αέρα, υπερασπίζοντας την αποικία από καταληψίες και αποτρέποντας τη σήψη^{181,182}. Επίσης προστατεύει την κυψέλη από ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες, ζύμες και βακτήρια¹⁸³. Τα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά διαφοροποιούνται ανάλογα με την βοτανική της προέλευση (διάφορα μεγέθη κόκκων, διαφορετικές αποχρώσεις και αρώματα)^{182,184}. Σε αντίθεση με την φυσική του μορφή (σκληρή και εύθρυπτη), μετά από ελαφρά θέρμανση γίνεται παχύρρευστο και κολλώδες, ενώ λιώνει σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται στους 60°C με 70°C¹⁸⁵. Λόγω των ιδιοτήτων της, η πρόπολη έχει προσελκύσει την προσοχή σε διάφορους ερευνητικούς τομείς με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών κυρίως στον τομέα των τροφίμων και της υγείας. Λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της, της δυσάρεστης οσμής και γεύσης της, η ενσωμάτωσή της στα τρόφιμα κρίνεται ως τεχνολογική πρόκληση αφού αυτά είναι χαρακτηριστικά που μειώνουν την αποδοχή ενός τροφίμου. Ένας ακόμη παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητά της η οποία εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και λιγότερο από το άθροισμα των συστατικών της. Η ενθυλάκωση είναι μια τεχνική με την οποία έχει έως τώρα αξιοποιηθεί η πρόπολη^{186,187}.

- ο Κερί

Στην φύση υπάρχουν διάφορα έντομα που είναι ικανά να παράγουν κερί, ωστόσο μόνο της μέλισσας αξιοποιείται από τον άνθρωπο. Το κερί είναι μια φυσική έκκριση των εργατριών μελισσών που σχηματίζεται στους κηρογόνους αδένες στην κοιλιά τους. Ειδικότερα, είναι ένα σύνθετο προϊόν που παράγεται από νεαρές μέλισσες (ηλικίας μεταξύ 12 και 18 ημερών), το οποίο όταν έρθει σε επαφή με τον αέρα γίνεται



Εικόνα 25. Κηρογόνοι αδένες *A. Mellifera*.

στερεό. Το στερεό πλέον μίγμα με την προσθήκη γύρης και πρόπολης μορφοποιείται από τις μέλισσες χτίζοντας την κηρήθρα.

Το κερί αποτελείται από περίπου 300 συστατικά που διαχωρίζονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, υδρογονάνθρακες,

εστέρες λιπαρών οξέων και λιπαρών αλκοολών, διεστέρων και εξωγενών ουσιών. Όπως και στα υπόλοιπα προϊόντα της κυψέλης, έτσι και στην περίπτωση του κεριού η γεωγραφική θέση της κυψέλης επηρεάζει την διατροφή της μέλισσας επομένως και την σύσταση του κεριού και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Αρχικά το μελισσοκέρι είναι λευκό ενώ μετά την ανάμειξη του με την γύρη και την πρόπολη λαμβάνει διάφορες αποχρώσεις του κίτρινου και του καφέ. Το χρώμα του σχετίζεται και με την ωρίμανσή του. Ο άνθρωπος χρησιμοποιεί το μελισσοκέρι για την παρασκευή κεριών, προϊόντα φινιρίσματος (πχ βερνίκια και γυαλιστικά), φάρμακα και καλλυντικά 188,189.

- ο Βασιλικός πολτός

Ο βασιλικός πολτός είναι έκκριση των κεφαλικών αδένων της μέλισσας και αποτελεί το σημαντικότερο μέρος της διατροφής των προνυμφών. Για τις πρώτες 2-3 ημέρες της ζωής τους αποτελεί την μόνη τροφή τους, ενώ για τη βασίλισσα είναι η ειδική τροφή για όλη τη διάρκεια της ζωής της γεγονός που της εξασφαλίζει και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής έναντι των εργατριών. Ο βασιλικός πολτός αποτελείται από 60-70% νερό, 12-15% ακατέργαστη πρωτεΐνη, 10-16% ολικά σάκχαρα, 3-6% λιπίδια, βιταμίνες, άλατα και ελεύθερα αμινοξέα. Το pH του κυμαίνεται από 3,6 έως 4,2. Λόγω της σύστασης του έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του

ενώ έχει συσχετισθεί γενικότερα με τους παράγοντες που βελτιώνουν την υγεία του ανθρώπου ^{190,191}.

- ο Δηλητήριο

Το δηλητήριο είναι μία έκκριση που προέρχεται από την κοιλιακή χώρα των μελισσών. Το τσίμπημα της μέλισσας προκαλεί πόνο λόγω τοπικής φλεγμονής που δημιουργεί, ενώ πολλές φορές μπορεί να προκαλέσει και αλλεργική αντίδραση. Παρά την αρνητική του δράση, έχει μελετηθεί ως προς τις πιθανές θεραπευτικές του ιδιότητες. Η σύστασή του είναι πολύπλοκη σε αντίθεση με το δηλητήριο άλλων εντόμων. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μια υδατική ουσία αφού αποτελείται κατά 80% από νερό, ενώ την υπόλοιπη σύστασή του συμπληρώνουν αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες, ένζυμα, σάκχαρα, βιογενείς αμίνες, πτητικές ενώσεις, φωσφολιπίδια και φερομόνες ^{192,193}.

Θεωρείται τοξική ουσία λόγω της συσχέτισής του με αλλεργικές αντιδράσεις, ωστόσο η θανατηφόρος δόση του είναι αρκετά υψηλή αφού αντιστοιχεί κατά μέσο όρο σε 2,8 mg δηλητηρίου ανά κιλό σωματικού βάρους. Τα συστατικά του και ο τρόπος με τον οποίον αλληλοεπιδρούν αποτελούν στόχο της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια λόγω της βιολογικής τους δράσης. Ειδικότερα, μεταξύ άλλων έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης και αντιμικροβιακή δράση του δηλητηρίου της μέλισσας ^{194,195}. Μία ένωση ενδιαφέροντος είναι η μελιτίνη η οποία έχει παρουσιάσει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ πιθανώς συμβάλει και στην αναγέννηση των μυών ^{196,197}. Τέλος, υπάρχουν ενθαρρυντικές μελέτες σχετικά με την θετική εμπλοκή του σε χρόνια νοσήματα όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ), η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ) και η ηπατική ίνωση (ΗΙ) ¹⁹⁸.

- ο Μέλι

Οι συλλέκτριες μέλισσες πετούν με σκοπό την συλλογή νέκταρ ή/και μελιτωμάτων χρησιμοποιώντας την μακρά σωληνοειδή προβοσκίδα τους, αποθηκεύοντας το νέκταρ στους προλοβούς τους. Το νέκταρ είναι ένα υγρό με γλυκιά γεύση που εκκρίνεται συνήθως από άνθη αλλά και βλαστούς και φύλλα των φυτών.

Είναι πλούσιο σε σάκχαρα και ο κύριος ρόλος του είναι να προσελκύει τους επικονιαστές.

Κατά την πτήση της επιστροφής τους προς την κυψέλη γίνεται και η πρώτη διάσπαση του μίγματος κυρίως μέσω του ενζύμου ινβερτάση που διασπά την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Καθ' όλη αυτή την διαδικασία οι μέλισσες χρησιμοποιούν μέρος του μίγματος για να τροφοδοτήσουν τους μύες πτήσης τους. Με την άφιξη της στην κυψέλη η συλλέκτρια συναντά την αποθηκάρια (παραλήπτρια) μέλισσα όπου μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται τροφάλλαξη της παραδίδει το μίγμα. Ειδικότερα, οι δύο μέλισσες ενώνουν τις κεραίες και τις σιαγόνες τους και η παραλήπτρια μέλισσα με την χρήση της γλώσσας της παραλαμβάνει το μίγμα. Η ανταλλαγή αυτή έχει διάρκεια μόλις λίγων δευτερολέπτων και επαναλαμβάνεται ώσπου ο προλοβός της συλλέκτριας να αδειάσει πλήρως. Έπειτα, η παραλήπτρια αρχίζει να μυρικάζει το μίγμα διασπώντας περαιτέρω τα σάκχαρα και μειώνοντας την υγρασία. Κατά την διαδικασία αυτή προστίθενται στο μίγμα τα απαραίτητα ένζυμα για την παρασκευή του μελιού.



Εικόνα 26. Διαδικασία τροφάλλαξης μεταξύ συλλέκτριας και παραλήπτριας (αποθηκάρια) μέλισσας.

Εν συνεχεία, οι παραλήπτριες μέλισσες εναποθέτουν το μίγμα στην κυψέλη με σκοπό να ωριμάσει και να πάρει την τελική του μορφή. Στο στάδιο αυτό οι αερίστριες μέλισσες αναλαμβάνουν να μειώσουν κι άλλο την υγρασία του μίγματος. Η

μείωση της υγρασίας είναι ιδιαίζουσας σημασίας καθώς η υψηλή υγρασία συχνά οδηγεί στην ανάπτυξη ζυμομυκήτων. Η εξάτμιση είναι μια διαδικασία που συχνά διαρκεί για αρκετές ημέρες αναλόγως των κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή. Τα επιθυμητά επίπεδα νερού είναι 16-18%, γεγονός που βοηθάει στην συμπίκνωση των σακχάρων δημιουργώντας κορεσμένο μίγμα, δηλαδή ένα μίγμα με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων διαλυμένα στο λιγοστό νερό που παραμένει. Τέλος,

όταν το κελί γεμίσει επαρκώς οι μέλισσες σφραγίζουν τα κελιά με κεριό προφυλάσσοντας τα έτσι τόσο από μολύνσεις όσο και από περαιτέρω εξάτμιση^{143,159}.

1.5.3 Σύσταση μελιού

Το μέλι είναι ένα σύνθετο μίγμα αποτελούμενο από περίπου 200 συστατικά. Το μεγαλύτερο ποσοστό του περιλαμβάνει μονοσακχαρίτες με σημαντικότερα την φρουκτόζη και την γλυκόζη καταλαμβάνοντας περίπου το 80% της σύνθεσής του ενώ υπάρχουν και σύνθετα σάκχαρα σε ποσοστό μικρότερο του 10%. Τα σάκχαρα είναι εκείνα που καθορίζουν τις φυσικοχημικές του ιδιότητες όπως το ιξώδες, η κρυστάλλωση, και η ρευστότητα¹⁹⁹. Η φρουκτόζη έχει χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, οπότε μέλια με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φρουκτόζη αποτελούν εναλλακτική λύση ως γλυκαντικές ουσίες για διαχείριση παθολογικών καταστάσεων όπως ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές ασθένειες. Επιπλέον η γλυκόζη και η φρουκτόζη λειτουργούν συνεργιστικά στον γαστρεντερικό σωλήνα και στο πάγκρεας, προάγοντας την απορρόφηση της εντερικής φρουκτόζης ή/και την έκκριση ινσουλίνης^{200,201}. Το νερό αποτελεί το 17% της σύστασης του μελιού. Οι ευεργετικές ιδιότητες του μελιού οφείλονται στο ότι είναι σημαντική πηγή διαφόρων θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πολυφαινόλων, μετάλλων και βιταμινών, συμβάλλοντας στην πρόληψη πολλών ασθενειών, παρά το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε αρκετά μικρό ποσοστό. Ένζυμα όπως η ινβερτάση, η διαστάση (αμυλάση), η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό του μελιού. Ειδικότερα, η ινβερτάση μετατρέπει τη σακχαρόζη σε μονοσακχαρίτες, η οξειδάση της γλυκόζης καταλύει το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου και η καταλάση (CAT) υποστηρίζει το σχηματισμό οξυγόνου και νερού από το υπεροξείδιο του υδρογόνου^{200,202,203}.

Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι ενώσεις που απαντώνται στο μέλι, όπως το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και οι πολυσακχαρίτες, έχουν μια σειρά βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών επιδράσεων, συμβάλουν στην πρόληψη του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ συνδέονται και με αντικαρκινικές ιδιότητες²⁰⁴⁻²⁰⁸. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με τα αντιοξειδωτικά του μελιού εντάσσονται κατά κύριο λόγο στην κατηγορία των

φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων. Τα φλαβονοειδή που βρίσκονται στο μέλι περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την χρυσίνη, ρουτίνη, κερκετίνη, κατεχίνη, απιγενίνη, γενιστεΐνη, λουτεολίνη, καμφερόλη κ.α.. Επιπλέον, φαινολικά οξέα όπως υδροξυκινναμικό οξύ, καφεϊκό οξύ, βανιλινικό οξύ, ελλαγικό οξύ, γαλλικό οξύ, υδροξυβενζοϊκό οξύ, κινναμωμικό οξύ, κουμαρικό οξύ, και φερουλικό οξύ έχουν εντοπισθεί στο μέλι ^{209,210}. Παρακάτω αναλύονται συνοπτικά ορισμένες ενώσεις του μελιού με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα.

Χρυσίνη: ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και εντοπίζεται κυρίως στο μέλι, την πρόπολη και ορισμένα φυτά. Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες σχετικά με τις ιδιότητες της χρυσίνης και έχει διαπιστωθεί μεταξύ άλλων η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, και αντιμικροβιακή της δράση ²¹¹. Συγκριτικά με άλλες ενώσεις όπως για παράδειγμα η κερκετίνη η χρυσίνη παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση *in vitro*, ωστόσο φαίνεται να είναι αρκετά αποδοτική σε *in vivo* μοντέλα σχετιζόμενα με το ήπαρ, την καρδιά, τους νεφρούς και άλλους ιστούς ²¹².

Καμφερόλη: είναι φλαβονοειδές κίτρινου χρώματος που υπάρχει σε πολλά φρούτα και λαχανικά, το τσάι και το μέλι. Η καμφερόλη είναι ικανή να επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 με σκοπό την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, συμβάλλοντας στην πρόληψη του καρκίνου μέσω τόσο της αντιοξειδωτικής όσο και της αντιφλεγμονώδους δράσης της ²¹³.

Κερκετίνη: πρόκειται για ένα φλαβονοειδές που απαντάται κυρίως σε φρούτα/λαχανικά, το μέλι και το τσάι. Εκδηλώνει την αντιοξειδωτική της δράση με διάφορους μηχανισμούς, ένας εκ των οποίων είναι η ρύθμιση των επιπέδων της γλουταθειόνης. Επιπλέον, μπορεί να ρυθμίσει διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος επάγοντας ή αναστέλλοντας την ρύθμιση εμπλεκόμενων μορίων διατηρώντας έτσι την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση ²¹⁴.

1.5.4 Η επίδραση του μελιού στην υγεία

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που επιβεβαιώνουν την θετική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης μελιού και της διαχείρισης διαφόρων παθήσεων λόγω της αντιβακτηριακής, αντιφλεγμονώδους, και αντιοξειδωτικής δράσης του ^{161,215,216}.

Από την αρχαιότητα το μέλι χρησιμοποιούνταν για την επούλωση τραυμάτων. Σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι επάγει τα λευκοκύτταρα ώστε να απελευθερώσουν κυτοκίνες οι οποίες με την σειρά τους συμβάλλουν στην επιδιόρθωση του ιστού που έχει υποστεί αλλοίωση. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές σχετικά με τον πολλαπλασιασμό των Β- και Τ-λεμφοκυττάρων και την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων ^{217,218}.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μέλι ενδείκνυται για χρήση ως γλυκαντικό λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού του δείκτη από ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη. Αποτελέσματα μελετών που ασχολήθηκαν με την χρήση του μελιού ως συμπλήρωμα της συμβατικής αντιδιαβητικής αγωγής (μεταξύ άλλων αντιοξειδωτικών) έδειξαν ότι οι δείκτες βελτιώθηκαν. Σε διαβητικά άτομα το μέλι είναι ικανό να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης, ενώ σε υγιή άτομα και υπερλιπιδικούς ασθενής μειώνει τα λιπίδια του αίματος. Η θεραπευτική επίδραση του μελιού ίσως να μπορεί να επεκταθεί στην βελτίωση συναφών μεταβολικών επιπλοκών ασθενειών ²¹⁹⁻²²¹.

Το μέλι διαθέτει προστατευτική δράση έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων η οποία βασίζεται κυρίως στην σύσταση του και ιδιαίτερα στις φαινολικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική του ικανότητα συσχετίζεται με την συνολική περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις, ωστόσο είναι πιθανό να προκύπτουν από την συνεργιστική τους δράση. Το αντιαιμοπεταλιακό δυναμικό που παρέχουν οι φαινολικές ενώσεις επιφέρει υπερενεργοποίηση των αιμοπεταλίων του αίματος διαδραματίζοντας τελικά σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, την στεφανιαία νόσο και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων. Παρά το γεγονός ότι οι ιδιότητες που ήδη ανφέρθηκαν προέκυψαν από πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών, λίγες από αυτές έγιναν σε ανθρώπους και ειδικότερα σε άτομα με υψηλούς παράγοντες κινδύνου (παχυσαρκία, υψηλή αρτηριακή πίεση κ). Τα αντιοξειδωτικά του μελιού σχετίζονται με την μείωση του κινδύνου στεφανιαίων καρδιακών διαταραχών κυρίως λόγω της δράσης αντιοξειδωτικών του τα οποία δρουν κυρίως μέσω 3 μηχανισμών: (α) βελτίωση της στεφανιαίας

αγγειοδιαστολής, (β) μείωση της ικανότητας των αιμοπεταλίων στο αίμα να πήζουν και (γ) αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας²²²⁻²²⁷.

Στο μέλι συμπεριλαμβάνονται ενώσεις που έχουν συνδεθεί με αντικαρκινικές ιδιότητες, παρά το γεγονός ότι η έρευνα στον τομέα αυτό είναι αρκετά πολύπλοκη. Πιθανολογείται, ότι η αντικαρκινική ιδιότητα του μελιού προκύπτει από την επαγωγή της απόπτωσης, την ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, την μείωση της φλεγμονής, την αναστολή της αγγειογένεσης και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω τροποποιήσεων σε μόρια όπως η κυκλοοξυγενάση, οδηγώντας στην απομάκρυνση ενδομεμβρανικών πρωτεϊνών και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Τέτοια δράση έχουν δείξει ενώσεις που απαντώνται στο μέλι όπως είναι η χρυσίνη. Επίσης, το μέλι λόγω της ρύθμισης πρωτεϊνών που συνδέονται με την απόπτωση θεωρείται ότι μπορεί να την επάγει. Παρά τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα το μέλι δεν μπορεί να θεωρηθεί αυτόνομη θεραπεία, αλλά ως ένας συνδυαστικός παράγοντας^{203,208}.

1.5.5 Κατηγοριοποίηση μελιών

Το μέλι έχει γίνει ευρέως αποδεκτό από τους καταναλωτές λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας καθώς και της γεύσης του. Η ποικιλομορφία του έχει προσελκύσει την προσοχή των καταναλωτών καθώς εκτός από τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και οι βιολογικές του δράσεις ποικίλλουν ανάλογα με το είδος. Η σύσταση καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού εξαρτώνται σχεδόν αποκλειστικά από την βοτανική προέλευση άρα και την τοποθεσία της κυψέλης. Τα μέλια διαχωρίζονται αρχικά σε μέλι νέκταρ και μέλι νέκταρ με μελιτώματα. Ανάλογα με τα επίπεδα των διαφορετικών ειδών γύρης που περιλαμβάνει διαχωρίζεται σε πολυανθικό και μονοανθικό^{228,229}. Ως μελίτωμα ορίζεται η έκκριση δένδρων (κυρίως κωνοφόρα), είτε οι εκκρίσεις εντόμων (αφίδες, λεπιδόπτερα κα.)²³⁰⁻²³². Ανεξαρτήτως του αρχικού διαχωρισμού και κατόπιν ανάλυσης ένα μέλι του οποίου το 50% τουλάχιστον της γύρης ανήκει σε ένα είδος φυτού χαρακτηρίζεται ως μονοανθικό, ενώ σε αντίθετη περίπτωση ως πολυανθικό²³³.

Η ζήτηση των μονοανθικών μελιών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια καθώς παρέχει στον καταναλωτή πιο συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με χαρακτηριστικά όπως είναι το χρώμα και η γεύση, αυξάνοντας έτσι την εμπορική του αξία. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει σε περιπτώσεις νοθείας μελιών ή σε εσφαλμένη κατηγοριοποίηση ως μονοανθικό. Για τον περιορισμό αυτών των περιπτώσεων γίνονται έρευνες για πιο αξιόπιστες μεθόδους διάκρισης τους τόσο ως προς το είδος όσο και ως προς τον εντοπισμό πιθανής νοθείας.²³⁴⁻²³⁶

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος κατηγοριοποίησης των μελιών είναι η γυρεοσκοπική ανάλυση, ωστόσο τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί και σε άλλες μεθόδους λόγω περιορισμών που έχουν εντοπισθεί σε αυτό τον τύπο ανάλυσης. Ο προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης ενός μελιού μέσω γυρεοσκοπικής ανάλυσης γίνεται μέσω της παρατήρησης των γυρεόκοκκων του μελιού στο μικροσκόπιο. Πρόκειται για μια χρονοβόρο μέθοδο η οποία απαιτεί αρκετά εξειδικευμένο προσωπικό. Αυτού του τύπου η ανάλυση βασίζεται αποκλειστικά στις ατομικές γνώσεις του αναλυτή γεγονός που αποτελεί πρόβλημα όταν πρέπει να αναγνωρισθούν κόκκοι με παρόμοια μορφολογία, ενώ είναι πολύ δύσκολο να εντοπισθούν οι περιπτώσεις νοθείας. Η γυρεοσκοπική ανάλυση είναι σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των ειδών μελιού, ωστόσο υπάρχει ανάγκη για μεθόδους που είτε θα λειτουργούν συνδυαστικά με την γυρεοσκοπική ανάλυση, είτε θα την αντικαταστήσουν²³⁷⁻²⁴⁰. Ένας επιπλέον τρόπος κατηγοριοποίησης των μελιών είναι οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (πχ pH, τα επίπεδα των βασικών σακχάρων, η οξύτητα, η αγωγιμότητα) που αποτελεί έναν τρόπο ένταξης τους σε κάποια κατηγορία και όχι ασφαλούς προσδιορισμού για κάποιο μονοανθικό μέλι. Τα τελευταία χρόνια η ανάλυση του DNA είναι αποτελεσματική για την σύγκριση των σφαιριδίων γύρης των μελισσών και της γύρης που περιέχεται στο μέλι των μελισσών ώστε τελικά να γίνει χαρακτηρισμός της βοτανικής προέλευσης του μελιού. Αφορά πρωτόκολλα τα οποία απαιτούν εργαστηριακό εξοπλισμένο με κατάλληλα όργανα τα οποία καταλήγουν σε ασφαλέστερα αποτελέσματα αφού τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων εξαρτώνται λιγότερο από τον αναλυτή. Ένα ακόμη πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ακόμη και σε δείγματα με χαμηλά επίπεδα γύρης η μέθοδος ανάλυσης του DNA είναι αξιόπιστη, έναντι της γυρεοσκοπικής ανάλυσης που απαιτεί υψηλότερη συγκέντρωση γύρης²⁴¹.

1.5.6 Επικονίαση

Επικονίαση είναι η διαδικασία κατά την οποία η γύρη μετακινείται από τους αρσενικούς ανθήρες στα θηλυκά στίγματα. Όταν η διαδικασία αυτή συμβαίνει στο ίδιο το φυτό ορίζεται ως αυτογονιμοποίηση, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταυρογονιμοποίηση^{242,243}. Τα φυτά βασίζονται πλήρως στους επικονιαστές ώστε να επιτευχθεί η σταυρογονιμοποίηση. Εκτός των μελισσών επικονιαστές είναι και άλλα



Εικόνα 27. Απεικόνιση της διαδικασίας της επικονίασης.

ζώα όπως τα πτηνά, διάφορα δίπτερα, οι πεταλούδες κ.α., ωστόσο η επικονίαση επιτυγχάνεται και μέσω του αέρα και του νερού²⁴⁴⁻²⁴⁷.

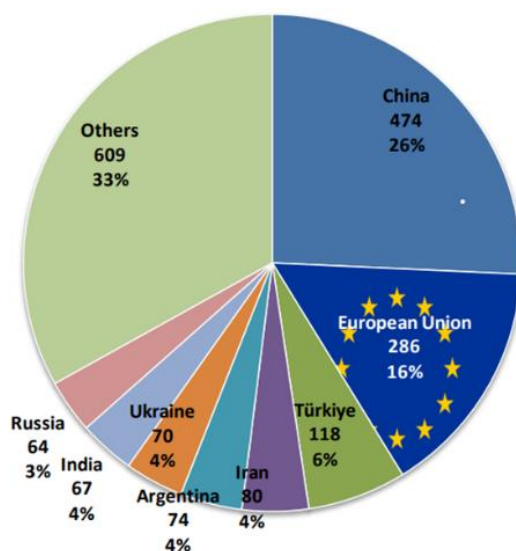
Εάν οι μέλισσες διέκοπταν την επικονίαση το 5-8% της συνολικής

παραγωγής καλλιεργειών παγκοσμίως θα χανόταν. Σε αυτή την περίπτωση θα ήταν επιτακτική ανάγκη η επέκταση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων ώστε να καλυφθεί η μείωση στην παραγωγή καθώς και η ανάλογη προσαρμογή της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν και διαταράσσουν την δράση των μελισσών, όπως είναι η κλιματική αλλαγή, τα φυτοφάρμακα και γενικότερα οι νέες τεχνικές διαχείρισης των καλλιεργήσιμων εκτάσεων. Λόγω της μείωσης του πληθυσμού τόσο των άγριων όσο και των οικόσιτων μελισσών έχει εντατικοποιηθεί μια προσπάθεια για χρήση άγριων επικονιαστών. Η αύξηση των ενδιαιτημάτων (φυσικό περιβάλλον στο οποίο ζει και αναπαράγεται ένα είδος ή ένας πληθυσμός ή μια βιοκοινότητα) των άγριων μελισσών κρίνεται απαραίτητη με σκοπό την αύξηση της επικονίασης, αφού θα πρέπει να τους παρέχεται ασφαλής ατμόσφαιρα για να παράγονται υγιείς καλλιέργειες. Παρά τα θετικά στοιχεία που προσθέτουν στις καλλιέργειες, τα αγροχημικά είναι επικίνδυνα τόσο για τον πληθυσμό των μελισσών όσο και για τον άνθρωπο. Η επικονίαση μέσω των μελισσών θα πρέπει να ενισχυθεί τόσο για την αποφυγή μιας επικείμενης επισιτιστικής κρίσης όσο και για λόγους που

σχετίζονται με το περιβάλλον, χωρίς να αγνοείται ο ρόλος των υπολοίπων επικονιαστών ²⁴⁸.

1.5.7 Οικονομικά στοιχεία

Οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις της Ελλάδας αποτελούν το 30% περίπου της συνολικής έκτασης της χώρας. Στην χώρα έχουν καταγραφεί περίπου 6000 διαφορετικά είδη φυτών εκ των οποίων τα 742 φύονται μόνο στην Ελλάδα. Οι κλιματολογικές συνθήκες είναι πολύ σημαντικές για τον τομέα της μελισσοκομίας, αφού αναλόγως του μικροκλίματος που επικρατεί στην περιοχή φύονται και διαφορετικά φυτά. Για τον λόγο αυτό οι μελισσοκόμοι που δραστηριοποιούνται στην χώρα ασχολούνται με την νομαδική μελισσοκομία, μετακινούν δηλαδή τις κυψέλες τους αναλογικά των ανθοφοριών. Η συλλογή του μελιού εξαρτάται κυρίως από την τοποθεσία της κυψέλης και συνήθως ξεκινάει τον Απρίλιο και λήγει νωρίς τον χειμώνα ²⁴⁹.



Εικόνα 28. Παγκόσμια παραγωγή μελιού για το έτος 2022. FAOSTAT

Η Κίνα είναι η χώρα με την υψηλότερη παραγωγή παγκοσμίως η οποία ανέρχεται στο ¼ της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) εισάγει μέλι αφού δεν καταφέρνει να καλύψει τις καταναλωτικές ανάγκες, παρά το γεγονός ότι είναι

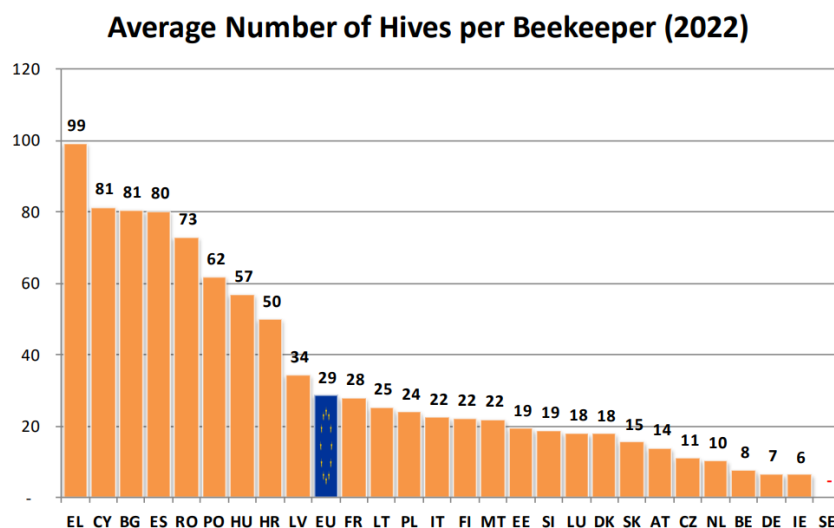
η 2^η παραγωγός χώρα με περίπου 230.000 τόνους ετησίως. Όσον αφορά την κατάταξη εντός της ΕΕ, η Ελλάδα είναι μία εκ των κορυφαίων παραγωγών χωρών με ετήσια παραγωγή περίπου 22.000 τόνων για το έτος 2022, αριθμό που αντιπροσωπεύει το 9,5% της παραγωγής της ΕΕ για το συγκεκριμένο έτος. Επιπλέον η χώρα παρουσιάζει

μια σταθερή αύξηση τα τελευταία 3 χρόνια αναφορικά με τις κυψέλες αλλά και τους ενεργούς μελισσοκόμους (Πηγή: FAOSTAT) ²⁵⁰.



Εικόνα 29. Αριθμός κυψελών ανά χώρα στην ΕΕ (αριστερά), και συνολικά στην ΕΕ (δεξιά).

Παρά την αύξηση των επαγγελματιών μελισσοκόμων ο συνολικός τους αριθμός υστερεί συγκριτικά με τις υπόλοιπες κορυφαίες παραγωγούς χώρες της ΕΕ, φέρνοντας ωστόσο την Ελλάδα στην 1^η θέση αναλογίας κυψελών ανά μελισσοκόμο με 99 κυψέλες/μελισσοκόμο.



Εικόνα 30. Αριθμός κυψελών που αντιστοιχούν ανά μελισσοκόμο ανάμεσα στις χώρες κράτη της ΕΕ.

Τέλος, η Ελλάδα είναι (μαζί με την Κροατία) η χώρα με την υψηλότερη ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση μελιού (2.46 κιλά), ενώ παγκοσμίως ο μέσος όρος ανέρχεται στα 0,23 κιλά ²⁵¹⁻²⁵³.

2. Σκοπός

Οι ευεργετικές επιδράσεις του μελιού είναι γνωστές από την αρχαιότητα, αφού υπάρχουν αναφορές, από ανεπτυγμένους για την εποχή πολιτισμούς όπως είναι οι Έλληνες και οι Σουμέριοι, όπου το μέλι χρησιμοποιούνταν τόσο ως τρόφιμο όσο και ως φάρμακο για εύρος παθήσεων. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το μέλι έχει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιπολλαπλασιαστική, αντικαρκινική και αντιμεταστατική δράση. Μεταξύ των 200 περίπου συστατικών που το αποτελούν υπάρχουν διάφορες βιοδραστικές ενώσεις που του χαρίζουν αυτές τις ιδιότητες είτε κατά μόνες είτε συνδυαστικά, με πιο γνωστές την χρυσίνη, την καμφερόλη, και την κερκετίνη. Το μέλι είναι ένα προϊόν που παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση αναλογικά της γεωγραφικής θέσης της κυψέλης, φαινόμενο που οφείλεται στις διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες, επομένως και στην διαφορετική βιοποικιλότητα που χαρακτηρίζει την κάθε περιοχή. Για τον λόγο αυτό οι εργασίες στην διεθνή βιβλιογραφία αφορούν μέλια που παράγονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές.

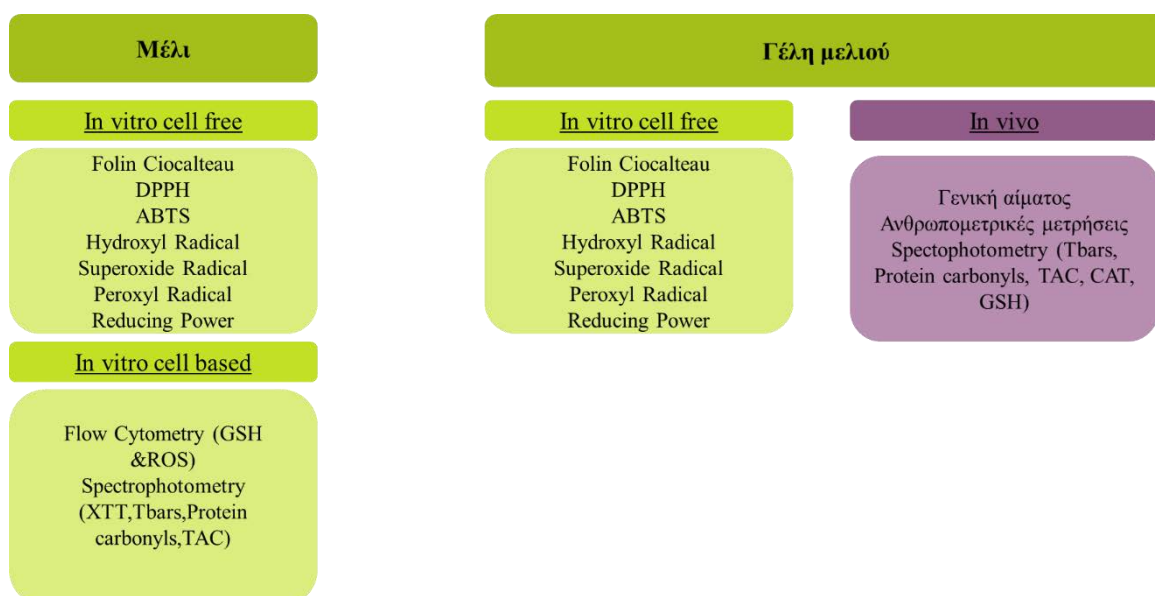
Η κατανάλωση μελιού στη χώρα μας είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα συγκριτικά με την Ευρώπη και τον κόσμο, ενώ αρκετά υψηλή θέση έχουμε και στην παραγωγή του αφού σύμφωνα με στοιχεία του 2022 είμαστε η 2^η παραγωγός χώρα της ΕΕ. Λόγω της μεγάλης βιοποικιλότητας καθώς και των κλιματολογικών συνθηκών που ευνοούν την διαβίωση της μέλισσας και τον χειμώνα, η Ελλάδα διαθέτει ιδανικές συνθήκες για την παραγωγή μελιού. Λόγω όσων περιγράφονται παραπάνω υπάρχει μια προσπάθεια τα τελευταία χρόνια τόσο από παραγωγούς όσο και από ερευνητικά κέντρα και πανεπιστήμια για την ανάδειξη των πιθανώς ευεργετικών επιδράσεων του μελιού και τελικά την αύξηση της προστιθέμενης αξίας του.

Αυτός είναι και ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, της οποίας αντικείμενο ήταν η μελέτη και ανάδειξη μελιών παραγόμενα στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου από μικρούς παραγωγούς, καθώς και η μελέτη ενός πρωτότυπου προϊόντος με βάση το μέλι το οποίο παράγεται επίσης στην περιοχή.

Επιλέχθηκαν αρχικά 16 δείγματα μελιού διαφορετικών κατηγοριών και αξιολογήθηκαν με *in vitro* cell free μεθόδους. Στην συνέχεια επιλέχθηκαν 6 μέλια τα οποία αξιολογήθηκαν σε *in vitro* μεθόδους, αυτή τη φορά σε κυτταρικά συστήματα.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε πλήρης *in vitro* έλεγχος σε μη κυτταρικά συστήματα στο προϊόν μελιού, καταλήγοντας σε κλινική μελέτη σε 20 υγιή άτομα. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίχθηκαν και έχουν ήδη δημοσιευθεί 6 διπλωματικές εργασίες (Πλίτσης, 2021; Λαγγούρα, 2022; Φορτωμάρη, 2022; Αγγελάκη, 2023; Άγκο, 2023; Χαρούλη, 2023) και 2 άρθρα σε διεθνή έγκυρα περιοδικά με κριτές.

Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε τόσο στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία όσο και σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας και θα περιγράφεται αναλυτικά σε κάθε κεφάλαιο της παρούσας διατριβής^{115,116,254-259}.



Εικόνα 31. Πειραματικός σχεδιασμός.

3. *In vitro cell-free* ανάλυση των μελιών

Σε αυτό το επίπεδο αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε σειρά μεθόδων για μια πρώτη αξιολόγηση της πιθανής αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μελιού. Πρόκειται για μεθόδους που συμβάλουν στον χαρακτηρισμό ενός φυσικού προϊόντος μέσω προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής, αναγωγικής και προστατευτικής έναντι της οξείδωσης του DNA ιδιότητας του καθώς και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου. Οι δοκιμασίες διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται πρωτόκολλα μέσω των οποίων αξιολογείται η ικανότητα του δείγματος να αναστείλει την δράση τεχνητών ριζών του εμπορίου (DPPH[•] και ABTS^{•+}) αλλά και ριζών που απαντώνται φυσικά στον οργανισμό [υδροξυλίου (OH[•]) και ανιόν σουπεροξειδίου (O₂^{•-})]^{256,260,261}. Η αναγωγική ισχύς ενός δείγματος αξιολογείται μέσω μιας δοκιμασίας που αξιολογεί την ικανότητά του να ανάγει τον Fe⁺³ σε Fe⁺². Μια ουσία με αναγωγική ικανότητα είναι ισχυρός δότης ηλεκτρονίων, ικανή να προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες που σχετίζονται με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις²⁶². Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται αποκλειστικά στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύος, αφού στην πραγματικότητα η παρουσία του Fe⁺² στο κύτταρο δεν είναι ωφέλιμη καθώς είναι ικανό να λειτουργήσει ως δότης ηλεκτρονίου καταλήγοντας στο σχηματισμό ελεύθερης ρίζας μέσω της αντίδρασης Fenton. Για τον προσδιορισμό της αντιγονιδιοτοξικής δράσης εκτιμήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να προστατεύουν την διπλή έλικα του DNA από θραύσματα που προκαλεί η ρίζα υπεροξυλίου (ROO[•]). Για την μέθοδο χρησιμοποιείται πηκτή αгарόζης, ενώ η ρίζα δημιουργείται τεχνητά^{260,263–265}. Επιπλέον, αξιολογήθηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Οι τεχνικές του κεφαλαίου αυτές παρά το γεγονός ότι είναι ευρέως αποδεκτές στην επιστημονική κοινότητα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα, χρησιμοποιούνται ωστόσο για προκαταρκτικούς ελέγχους όπως και στην παρούσα διατριβή.

3.1 Υλικά και μέθοδοι της *in vitro* cell-free ανάλυσης

Τα δείγματα μελιού συλλέχθηκαν στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου και στάλθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών από τους παραγωγούς και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε γυάλινη συσκευασία. Όλα τα μέλια εξετάστηκαν ωμά, ωστόσο για να είναι δυνατή η χρήση τους στην πειραματική διαδικασία διαλύονταν σε απιονισμένο νερό. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα σε διαφορετική συγκέντρωση τόσο ανάλογα του πρωτοκόλλου όσο και του τύπου μελιού, την ημέρα του πειράματος αφού ζυγίζονταν και γινόταν η προσθήκη του νερού ζεσταινόταν σε θερμοκρασία 40-45 °C για 5' ώστε να γίνει ομογενοποίηση του διαλύματος. Στον Πίνακα 3 αναγράφεται το είδος του μελιού, η τοποθεσία της κυψέλης και ημερομηνία συλλογής τους.

Πίνακας 3. Στοιχεία αναφορικά με την τοποθεσία των κυψελών και την ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην Διατριβή

Μονοανθικά μέλια			Πολυανθικά μέλια		
Πηγή μελιού	Τοποθεσία κυψέλης	Ημερομηνία συλλογής	Πηγή μελιού	Τοποθεσία κυψέλης	Ημερομηνία συλλογής
Βελανιδιά	Ανατολικό Ζαγόρι	30-07-2020	Δάσους	Ελάτη Ζαγορίου	07-2020
Μέντα	Χαράδρα Βίκου	15/06/2020	Ανθόμελο βουνού με μελιτώματα βελανιδιάς	Δίλοφο Ζαγορίου, νομός Ιωαννίνων	08-2020
Έλατος – Άνθη του βουνού	Χριστοί Άρτης	05-07-2020	Ανθόμελο βουνού και μελιτώματα	Πραμαντά, Δήμος Βορείων Τζουμέρκων	15-06-2020
Καστανιά	Βασιλικό Παγωνίου	5-10/8/2020	Ανθόμελο βουνού και μελιτώματα	Πραμαντά, Δήμος Βορείων Τζουμέρκων	15-08-2020
Δρύς-Βελανιδιά	Ελάτη Ζαγορίου	15-7-2020	Ανθόμελο του βουνού	Τσεπέλοβο Ζαγορίου, Ιωαννίνων	08-2020
Γαλάζιο αγκάθι (1)	Μπελόη, Χαράδρα Βίκου	16-07-2020	Ανθόμελο (1)	Χαράδρα Βίκου	07-2020
Γαλάζιο Αγκάθι (2)	Μπελόη, Χαράδρα Βίκου	20-08-2020	Ανθόμελο (2)	Βίτσα Ζαγορίου, Ιωαννίνων	07-2020
Γαλάζιο αγκάθι (3)	Μπελόη, Χαράδρα Βίκου	22-08-2020	Ανθόμελο (3)	Ανθοχώρι Μετσόβου	28-7-2020

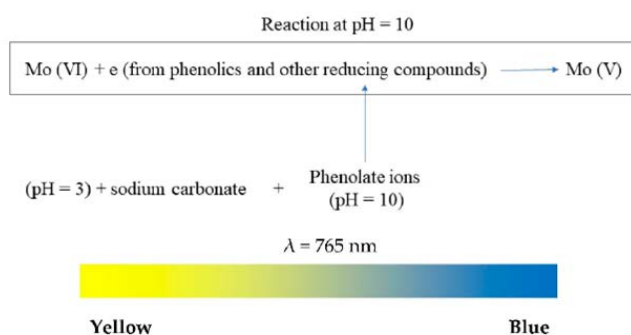
3.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC). Το FC είναι ένα εμπορικό σκεύασμα σύνθετων πολυμερών ιόντων τα οποία σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα, και έχει την ικανότητα να οξειδώνει τα

φαινολικά ιόντα ενώ την ίδια στιγμή ανάγει τα ετροπολυμερή οξέα. Το προϊόν είναι μπλε χρώματος και αποτελεί σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W), απορροφώντας στα 765 nm (Εικόνα 32). Στην αντίδραση προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 το οποίο ρυθμίζοντας την αλκαλικότητα εξασφαλίζει την παρουσία των φαινολικών ιόντων χωρίς να επηρεάζει την δράση του αντιδραστηρίου FC. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει ποσοτικά το πολυφαινολικό περιεχόμενο χωρίς να διακρίνει συγκεκριμένες ενώσεις. Η απόχρωση του μπλέ είναι αναλογική της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο δείγμα, όπου όσο πιο έντονο είναι τόσο υψηλότερη η συγκέντρωση

Chemical reaction:



Εικόνα 32. Μέθοδος Folin - Ciocalteu

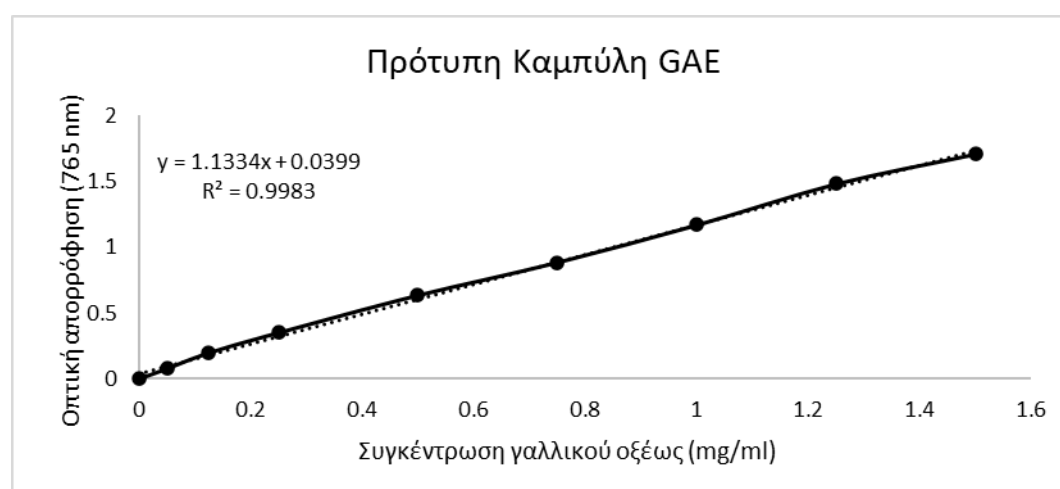
Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση 500mg μέλι/ml H₂O. Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 2 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια σε σειρά και ποσότητες για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.

	Τυφλό (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
dH ₂ O	1020	1000	1100
FC	100	100	-
Δείγμα μελιού	-	20	20
Επώαση 3' στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου.			
Na ₂ CO ₃	280	280	280
H ₂ O	600	600	600
Υτελ	2000	2000	2000

Την προσθήκη των αντιδραστηρίων ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 765 nm. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν 3 φορές, και τους αφαιρέθηκε η τιμή της οπτικής απορρόφησης αρνητικού μάρτυρα στα 765 nm. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος (GAE). Για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης ακολουθήθηκε το ανωτέρω πρωτόκολλο με το οποίο ωστόσο αξιολογήθηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων του GAE. Τα αποτελέσματα για το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των μελιών εκφράστηκαν σε mg GAE/g μελιού.

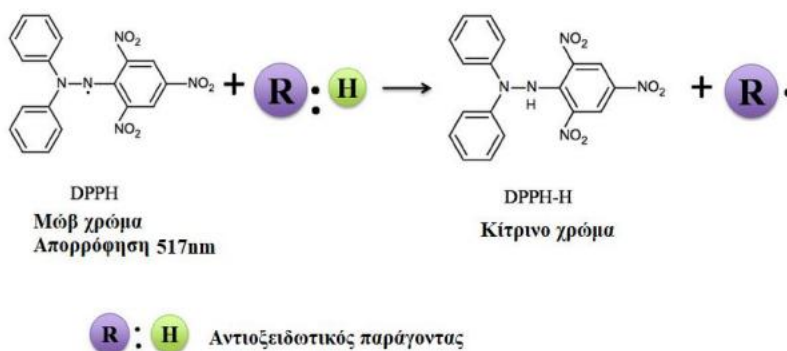


Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (GAE)

3.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητα ενός δείγματος που αποδεικνύεται με την αναγωγή της ρίζας DPPH• (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλνυδραζύλ) σε DPPH:H (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλνυδραζίνη) μέσω της πρόσληψης ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e⁻). Αρχικά η τεχνητή ρίζα DPPH είναι μωβ χρώματος και αναλόγως της συγκέντρωσης της ουσίας που αξιολογείται αποχρωματίζεται ενώ παράλληλα μειώνεται και η οπτική απορρόφηση η οποία μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517 nm^{254,268}.



Εικόνα 33. Μηχανισμός αντίδρασης 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλνυδραζύλ (DPPH) με αντιοξειδωτικό παράγοντα. R: H = αντιοξειδωτικός παράγοντας. R = σχηματιζόμενη ρίζα του αντιοξειδωτικού παράγοντα

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση 500mg μέλι/ml H₂O ακολουθούμενο από 5 διαδοχικές αραιώσεις σε dH₂O. Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 5. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Τυφλό (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
Δείγμα μελιού	-	-	50	50
Μεθανόλη	1000	950	900	950
DPPH•, 2mM	-	50	50	-
Υπελ	1000	1000	1000	1000

Στην συνέχεια ακολούθησε έντονη ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η μέτρηση έγινε στα 517 nm. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μέτρηση της οπτική απορρόφησης όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού σε μεθανόλη σε περίπτωση που το δείγμα απορροφά στα 517 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

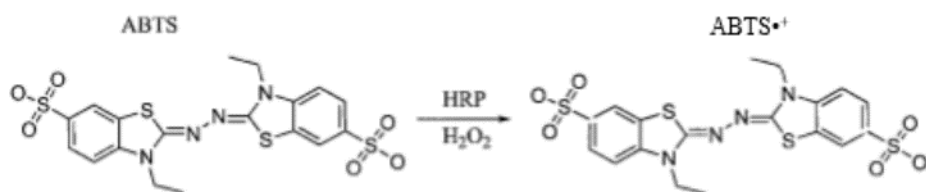
$$\% \text{ εξουδετέρωσης του DPPH} \bullet = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε IC50 το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που απαιτείται για την αναστολή του 50% της ρίζας. Προκειμένου να υπολογισθεί η τιμή IC50 εξετάστηκε ένας εύρος συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου δείγματος. Από την κάθε συγκέντρωση προέκυψε μια τιμή ίση με την ποσοστιαία αναστολή της ρίζας. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία καμπύλης από την οποία προέκυψε εξίσωση που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του IC50. Η τιμή IC50 είναι αντιστρόφως ανάλογη της δραστηριότητας, αφού όσο μικρότερη είναι τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα του δείγματος να αναστέλλει την ρίζα.

3.1.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS

Αρχή μεθόδου

Η ρίζα του ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Εικόνα 34). Η ρίζα πρέπει πρώτα να σχηματισθεί και έπειτα να προστεθεί το προς εξέταση δείγμα. Το διάλυμα έχει έντονο πράσινο χρώμα και αποχρωματίζεται αναλογικά της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου δείγματος^{254,258}.



Εικόνα 34. Παραγωγή της ρίζας ABTS μετά την προσθήκη του HRP στην αντίδραση

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση 250 mg μέλι/ml H₂O ακολουθούμενο από 5 διαδοχικές αραιώσεις σε dH₂O. Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 6. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Τυφλό (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
dH ₂ O	450	400	400	450
ABTS, 1mM	500	500	500	500
H ₂ O ₂ , 30 μM	50	50	50	50
HRP, 6μM	-	50	50	-
Vτελ	1000	1000	1000	1000
Επώαση 45' στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου				
Δείγμα μελιού	-	-	50	50

Στην συνέχεια ακολούθησε έντονη ανάδευση και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης φασματοφωτομετρικά στα 730 nm. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού σε περίπτωση που το δείγμα απορροφά στα 730 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

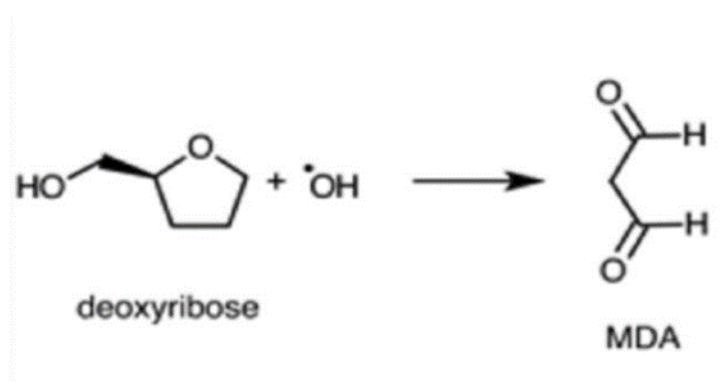
Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε IC₅₀ το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που απαιτείται για την αναστολή του 50% της ρίζας. Προκειμένου να υπολογισθεί η τιμή IC₅₀ εξετάσθηκε ένας εύρος συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου δείγματος. Από την κάθε συγκέντρωση προέκυψε μια τιμή ίση με την ποσοστιαία αναστολή της ρίζας. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία

καμπύλης από την οποία προέκυψε εξίσωση που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του IC50. Η τιμή IC50 είναι αντιστρόφως ανάλογη της δραστηριότητας, αφού όσο μικρότερη είναι τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα του δείγματος να αναστέλλει την ρίζα.

3.1.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα υδροξυλίου OH[•]

Αρχή μεθόδου

Η ρίζα υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα επιβλαβής λόγω της υψηλής δραστηριότητάς της. Αλληλοεπιδρώντας με βιομόρια είναι ικανή να προκαλέσει βλάβες που σχετίζονται με την μεταλλαξιγένεση, την καρκινογένεση και την κυτταροτοξικότητα αφού προκαλούν βλάβες στις μεμβράνες μέσω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων της. Επιπλέον οι ρίζες υδροξυλίου συμμετέχουν στην δημιουργία περαιτέρω ενεργών ειδών οξυγόνου, όπως το μονήρες οξυγόνο (1O_2), μια ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση του μοριακού οξυγόνου ²⁶⁹. Η ικανότητα μιας ουσίας να εξουδετερώνει την ρίζα του υδροξυλίου σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Οι OH[•] προκύπτουν κατά την αντίδραση Fenton και δρουν οξειδώνοντας την 2-δεοξυριβόζη την οποία διασπούν σε μαλονδιαλδεϋδη (MDA). Επομένως, η αξιολόγηση των δειγμάτων με αυτή την μέθοδο συνδέεται με την ικανότητα τους να εμποδίζουν την οξείδωση της 2-δεοξυριβόζης (Εικόνα 35) ^{254,270}.



Εικόνα 35. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση 125 mg μέλι/ml H₂O ακολουθούμενο από 5 διαδοχικές αραιώσεις σε dH₂O. Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 7. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Τυφλό (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
Phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)	225	225	225	225
2-deoxyribose, 10mM	75	75	75	75
FeSO ₄ -EDTA, 10mM	75	75	75	75
H ₂ O ₂ , 10mM	-	75	75	-
dH ₂ O	375	300	225	300
Δείγμα μελιού	-	-	75	75
Επώαση 60' στους 37°C				
TCA 2.8% w/v	375	375	375	375
TBA 1% w/v (σε NaOH 50mM)	375	375	375	375
Υτελ	1500	1500	1500	1500

Την προσθήκη των TCA 2.8% και TBA 1% ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10' στους 95 °C. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα επωάζονται για 5' στον πάγο ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρώνονται στα 3000rpm για 5'. Η οπτική απορρόφηση μετράται φασματοφωτομετρικά στα 520 nm. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού σε περίπτωση που το δείγμα απορροφά στα 520 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε IC50 το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που απαιτείται για την αναστολή του 50% της ρίζας. Προκειμένου να υπολογισθεί η τιμή IC50 εξετάσθηκε ένας εύρος συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου δείγματος. Από την κάθε συγκέντρωση προέκυψε μια τιμή ίση με την ποσοστιαία αναστολή της ρίζας. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία καμπύλης από την οποία προέκυψε εξίσωση που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του IC50. Η τιμή IC50 είναι αντιστρόφως ανάλογη της δραστηριότητας, αφού όσο μικρότερη είναι τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα του δείγματος να αναστέλλει την ρίζα.

3.1.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για μια ρίζα που παράγεται ενδογενώς στον οργανισμό και μπορεί να είναι πολύ επιβλαβής για το κύτταρο αφού μεταξύ άλλων μπορεί να ανοικοδομήσει το DNA. Σχηματίζεται μέσω του συστήματος PMS - NADH μετά από την οξείδωση του NADH και αναλύεται έμμεσα μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\bullet-}$ μετατρέπει το κίτρινο χρώμα του NBT^{2+} σε έντονο μωβ, ωστόσο ουσίες με αντιοξειδωτική ικανότητα αναστέλλοντας την δράση του $O_2^{\bullet-}$ μειώνουν τον σχηματισμό του NBT, διαδικασία η οποία εκτιμάται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm^{254,271}.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση 500 mg μέλι/ml H_2O ακολουθούμενο από 5 διαδοχικές αραιώσεις σε dH_2O . Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 8. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Τυφλό (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
Δείγμα μελιού	-	-	50	50
dH_2O	50	50	-	-
Tris-HCL buffer (16mM, pH 8.0)	800	625	625	750
NBT, 300 μM	125	125	125	125
NADH, 468 μM	125	125	125	125
PMS, 60 μM	-	125	125	-
Vτελ	1000	1000	1000	1000

Αφού προστέθηκαν τα διαλύματα με την σειρά που αναγράφονται στον Πίνακα 8, ακολούθησε επώαση για 5' στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 560 nm. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού σε περίπτωση που το δείγμα απορροφά στα

560 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

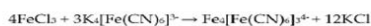
Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν σε IC50 το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που απαιτείται για την αναστολή του 50% της ρίζας. Προκειμένου να υπολογισθεί η τιμή IC50 εξετάσθηκε ένας εύρος συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου δείγματος. Από την κάθε συγκέντρωση προέκυψε μια τιμή ίση με την ποσοστιαία αναστολή της ρίζας. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία καμπύλης από την οποία προέκυψε εξίσωση που τελικά χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του IC50. Η τιμή IC50 είναι αντιστρόφως ανάλογη της δραστηριότητας, αφού όσο μικρότερη είναι τόσο υψηλότερη είναι η ικανότητα του δείγματος να αναστέλλει την ρίζα.

3.1.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας μέσω της μεθόδου Reducing Power

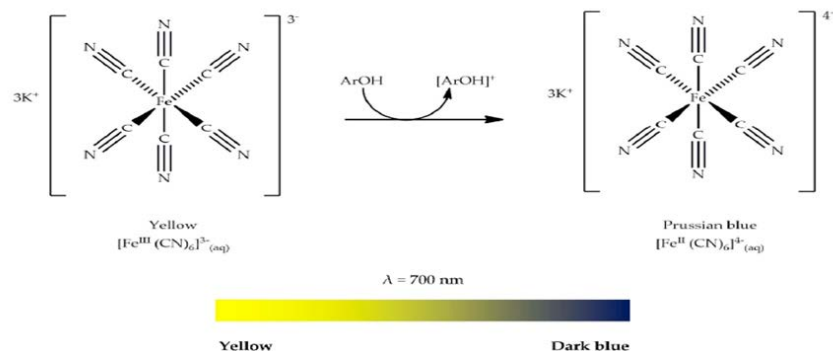
Αρχή μεθόδου

Δείγματα τα οποία έχουν την ικανότητα να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα κατόπιν της λιπιδικής υπεροξείδωσης δρουν ως πρωταρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Κατά την μέθοδο αυτή διερευνώνται ουσίες που μπορούν να κάνουν την αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Έπειτα ο Fe^{2+} αντιδρά με τον χλωριούχα σίδηρο καταλήγοντας σε σύμπλοκο που απορροφά στα 700 nm. Το διάλυμα με την προσθήκη του χλωριούχου σιδήρου και αναλογικά της συγκέντρωσης του δείγματος κυμαίνεται από κίτρινο έως έντονο πράσινο^{254,272}.

Chemical reaction:



Mechanism of reaction:



Εικόνα 36. Αναγωγή του σιδήρου και αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση stock 500 mg μέλι/ml H_2O ακολουθούμενο από 5 διαδοχικές αραιώσεις σε Phosphate buffer (0.2M, pH 6.6). Στη συνέχεια και σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 9. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Τυφλό (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας (μl)
Δείγμα μελιού	-	-	50	50
Phosphate buffer (0.2M, pH 6.6)	500	250	200	450
Potassium ferricyanide	-	250	250	-
Επώαση 20' στους 50°C				
TCA 10% w/v	250	250	250	250
Φυγοκέντρηση για 10' στα 3000 rpm Συλλογή και μεταφορά υπερκειμένου σε νέα πλαστικά σωληνάκια Eppendorf όγκου 1,5 ml				
dH ₂ O	250	250	250	250
Ferric chloride	50	50	50	50
Vτελ	1000	1000	1000	1000

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας όπως αυτή περιγράφεται στον Πίνακα 9, ακολουθεί επώαση για 10' στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 700 nm. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης όλων των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων του μελιού σε περίπτωση που το δείγμα απορροφά στα 700 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$AU_{0,5} = A_{\delta} - A_o$$

Όπου A_{δ} η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 700 nm και A_o η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 700 nm.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε $AU_{0,5}$ το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση που χρειάζεται ώστε η αντίδραση να έχει τιμή απορρόφησης ίση με 0,5.

3.1.7 Επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO^*) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Αρχή μεθόδου

Με την μέθοδο αυτή αξιολογείται η ικανότητα των δειγμάτων να προστατεύουν το DNA από μονόκλωνα θραύσματα προκαλούμενα από ελεύθερες ρίζες. Το πλασμιδιακό DNA είναι κυκλικό μόριο μικρού μεγέθους το οποίο μπορείς να απομονώσεις εύκολα και σε επαρκής ποσότητες. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ίδια η φύση του πλασμιδιακού DNA, το οποίο εμφανίζει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του, μετά την ηλεκτροφόρησή του. Οι διαμορφώσεις είναι:

- ❖ υπερελικωμένη διαμόρφωση (supercoiled conformation): πρόκειται για την πιο συμπηκνωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, στην οποία δε φέρει θραύσματα
- ❖ ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση (open circular, relaxed conformation): είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, στην οποία μεταβαίνει έπειτα από μονόκλωνες θραύσεις
- ❖ γραμμική διαμόρφωση (linear conformation): είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, στην οποία μεταβαίνει έπειτα από δίκλωνες θραύσεις

Λόγω μεγέθους η υπερελικωμένη διαμόρφωση είναι εκείνη που διαπερνά πιο εύκολα και γρήγορα τους πόρους του gel αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση, έπειτα η γραμμική και τέλος η ανοιχτή κυκλική. Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση τόσο πιο γρήγορα κινείται κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης για τον λόγο αυτό η υπερελικωμένη μορφή εμφανίζεται πιο χαμηλά στο πήκτωμα της αγαρόζης ^{254,273}.

Πειραματική διαδικασία

Η DNA προστατευτική δράση των μελιών, αξιολογείται από την ικανότητά τους να αναστέλλουν την δράση της ρίζας περοξυλίου (ROO[•]) που μετατρέπει την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA είτε στην ανοιχτή κυκλική είτε στη γραμμική διαμόρφωση.

Για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας 2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH), ο οποίος μετά από θερμική διάσπαση δημιουργεί ρίζες περοξυλίου (ROO[•]). Οι ROO[•] μοιάζουν με ριζικά παράγωγα που προκύπτουν φυσιολογικά από την λιπιδική υπεροξείδωση και εξ ορισμού προκαλούν μονόκλωνα θραύσματα στο DNA, οπότε και αλλαγή διαμόρφωσης.

Αρχικά παρασκευάσθηκε gel αγαρόζης πυκνότητας 0,8% στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο 1% (w/v). Αφού έγινε διαλυτοποίηση των μελιών σε συγκέντρωση stock 250 mg μέλι/ml H₂O πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις σε PBS. Το πλασμιδιακό DNA πρέπει να είναι σε ποσότητα 3,2 μg στην αντίδραση. Οι ποσότητες για τα πειράματα της παρούσας διατριβής έχουν διαμορφωθεί βάσει αυτού και έχουν τροποποιηθεί αναλόγως ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 10 μl. Σε πλαστικά σωληνάκια όγκου 0,5 ml προστέθηκαν με την σειρά του πίνακα:

Πίνακας 10. Τα αντιδραστήρια σε ποσότητες και η σειρά με την οποία προστίθενται στην αντίδραση

	Αρνητικός μάρτυρας (μl)	Θετικός μάρτυρας (μl)	Δείγμα (μl)	Αρνητικός μάρτυρας δείγματος στην υψηλότερη συγκέντρωση (μl)
PBS	8	4	1	5
Πλασμιδιακό DNA (3,2 μg)	2	2	2	2
ΑΑΡΗ	-	4	4	-
Δείγμα	-	-	3	3
Ντελ	10	10	10	10

Ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων και στη συνέχεια επώαση για 45' σε θερμοκρασία 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3 μl loading buffer (0,25% χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη) το οποίο εκτός από χρώση διακόπτει και την αντίδραση. Κάθε δείγμα εξετάστηκε και στην μέγιστη συγκέντρωση απουσία του ΑΑΡΗ ώστε να διαπιστωθεί ότι το δείγμα δεν έχει κάποια επίδραση στο DNA. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση αυτή αποκλείστηκε και χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες. Οι αντιδράσεις φορτώθηκαν στο πήκτωμα αгарόζης στο οποίο ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για 80 λεπτά. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8).

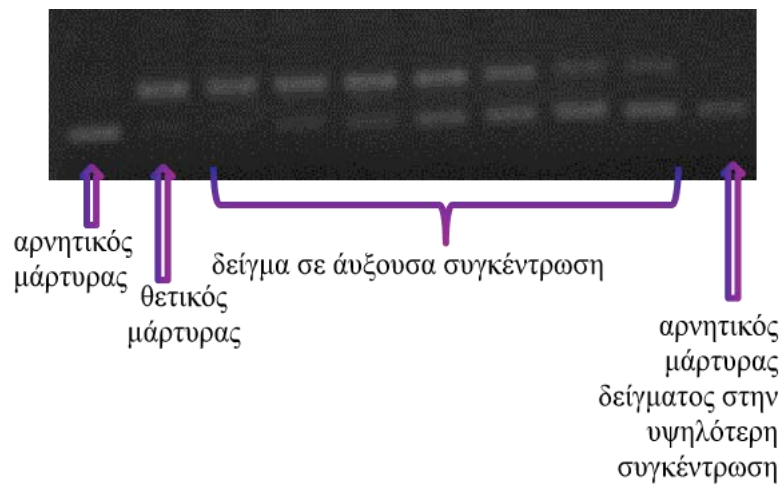
Η ποσοτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ImageJ ενώ πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα. Με το τέλος της ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε η τιμή IC50 για το κάθε δείγμα, δηλαδή η συγκέντρωση που αναστέλλει κατά 50% τη μετάβαση του πλασμιδίου από την υπερελικωμένη στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, η οποία προκύπτει από την καμπύλη αναστολής/συγκέντρωσης. Ο υπολογισμός έγινε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_{\theta} - S_{\delta}) / (S_{\theta} - S_0)] \times 100$$

S_{θ} : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο θετικό μάρτυρα

S_{δ} : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στο δείγμα

S_0 : Ποσοστό υπερελικωμένης διαμόρφωσης στον αρνητικό μάρτυρα



Εικόνα 37. Παράδειγμα πηκτώματος αгарόζης για ένα από τα δείγματα της παρούσας διατριβής.

3.1.8 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του κεφαλαίου έγινε χρήση του στατιστικού προγράμματος GraphPad Prism (έκδοση GraphPad Prism 9.0.0). Για την σύγκριση μεταξύ πολυανθικών και μονοανθικών μελιών χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Mann-Whitney test καθώς τα αποτελέσματα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Τα δεδομένα απεικονίζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SD (standard deviation = τυπική απόκλιση). Ωστε να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό θα πρέπει το επίπεδο σημαντικότητας να είναι μικρότερο ή ίσο του 0,05 $p \leq 0.05$.

Πραγματοποιήθηκε επίσης έλεγχος για την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των μελιών και της δράσης τους στις υπόλοιπες μεθόδους. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή συσχέτισης Pearson R test, επίσης με την χρήση του προγράμματος GraphPad Prism (έκδοση GraphPad Prism 9.0.0). Ωστε να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό θα πρέπει το επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

3.2 Αποτελέσματα

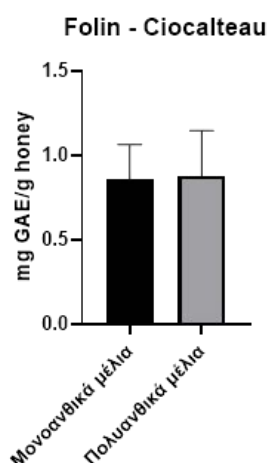
3.2.1 Αποτελέσματα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου - Folin Ciocalteu

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για του προσδιορισμού του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων μελιού. Συνολικά τα μέλι Δάσους είναι αυτό που παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ωστόσο αναφορικά με τα μονοανθικά μέλια το μέλι βελανιδιάς είναι εκείνο με το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων μελιού (TPC) μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu.

Μονοανθικά	mg GAE/g μελιού	Πολυανθικά	mg GAE/g μελιού
Βελανιδιά	1,238	Δάσους	1,317
Μέντα	0,661	Δάσους με μελίτωμα βελανιδιάς	1,154
Έλατος	0,604	Ανθόμελο του βουνού με μελίτωμα (1)	0,597
Καστανιά	0,920	Ανθόμελο του βουνού με μελίτωμα (2)	0,48
Δρύς – Βελανιδιά	1,035	Ανθόμελο του βουνού	0,866
Γαλάζιο Αγκάθι (1)	0,838	Ανθόμελο (1)	0,861
Γαλάζιο Αγκάθι (2)	0,796	Ανθόμελο (2)	0,895
Γαλάζιο Αγκάθι (3)	0,785	Ανθόμελο (3)	0,853

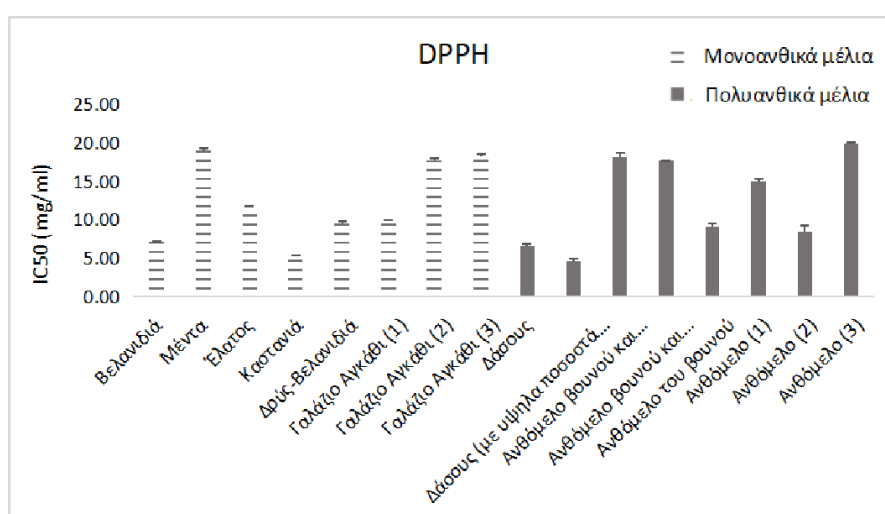
Από την συγκριτική ανάλυση μεταξύ των 2 κατηγοριών μελιών δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά αφού οι δύο ομάδες φαίνεται συνολικά να έχουν παρόμοια επίπεδα πολυφαινολών όπως αυτά παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. *στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).

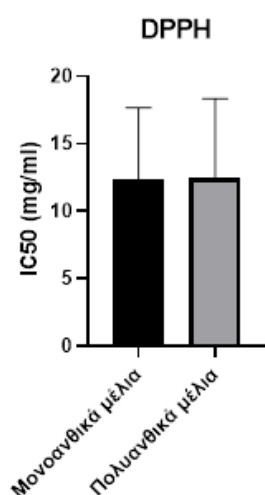
3.2.2 Αποτελέσματα ως προς την ικανότητα των δειγμάτων μελιού να ανάγουν την ρίζα DPPH

Τα αποτελέσματα αναφορικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού για την μέθοδο DPPH, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3. Ισχυρότερο μέλι αναδείχθηκε αυτό της Καστανιάς από την κατηγορία των μονοανθικών, και το μέλι Δάσους με υψηλά ποσοστά μελιτώματος βελανιδιάς από την κατηγορία των πολυανθικών μελιών.

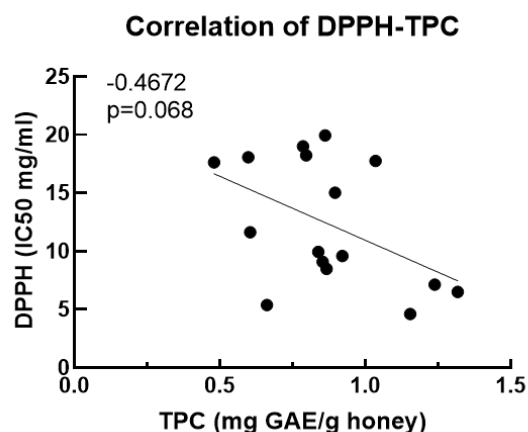


Διάγραμμα 3. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο DPPH.

Από την σύγκριση μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών μελιών δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Διάγραμμα 5). Έγινε επίσης συσχέτιση μεταξύ του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και των τιμών IC50 της μεθόδου DPPH, χωρίς όμως να προκύψει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.



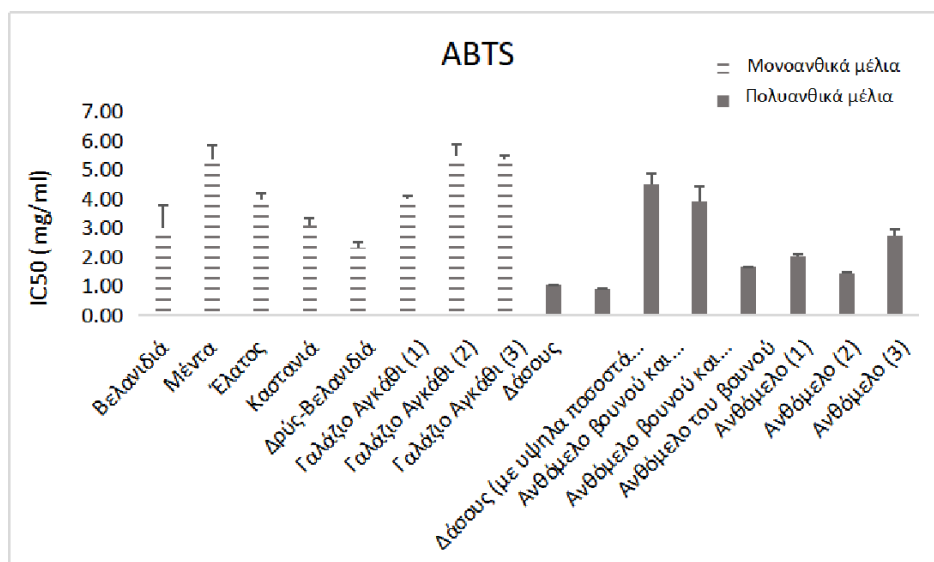
Διάγραμμα 4. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).



Διάγραμμα 5. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου DPPH.

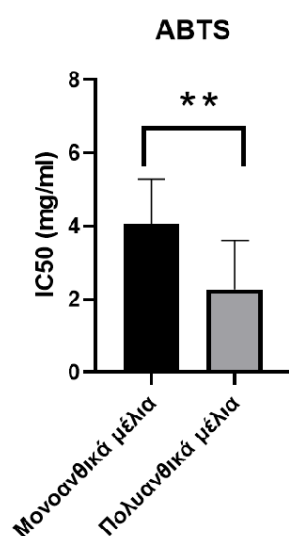
3.2.3 Αποτελέσματα ως προς την ικανότητα των δειγμάτων μελιού να ανάγουν την ρίζα ABTS

Τα αποτελέσματα αναφορικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού για την μέθοδο ABTS, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 6. Ισχυρότερα δείγματα μελιού αναδείχθηκαν τα Δάσους από την κατηγορία των πολυανθικών μελιών. Στην κατηγορία των μονοανθικών την υψηλότερη ικανότητα αναγωγής της ρίζας ABTS παρουσίασε το δείγμα Δρυς Βελανιδιάς. Ωστόσο στο σύνολό τους τα μονοανθικά μέλια παρουσίασαν λιγότερο ισχυρή δράση σχετικά με τα πολυανθικά.

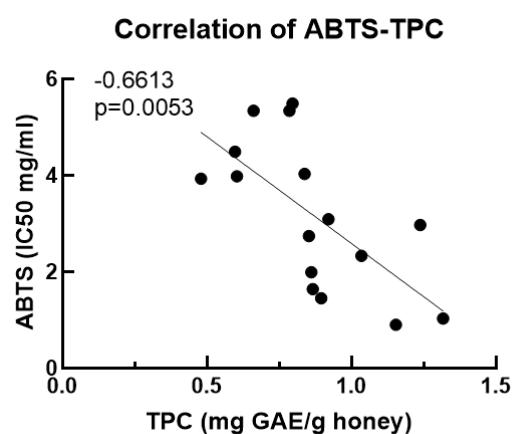


Διάγραμμα 6. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο ABTS.

Στην μέθοδο ABTS τα πολυανθικά δείγματα μελιού παρουσίασαν υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ρίζας όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 7, από το οποίο προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ($p \leq 0,01$). Επίσης μετά την συσχέτιση μεταξύ πολυφαινολικού περιεχομένου και των τιμών IC50 της μεθόδου ABTS προκύπτει μια ισχυρή τάση ($p=0,0053$) για αρνητική συσχέτιση, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.



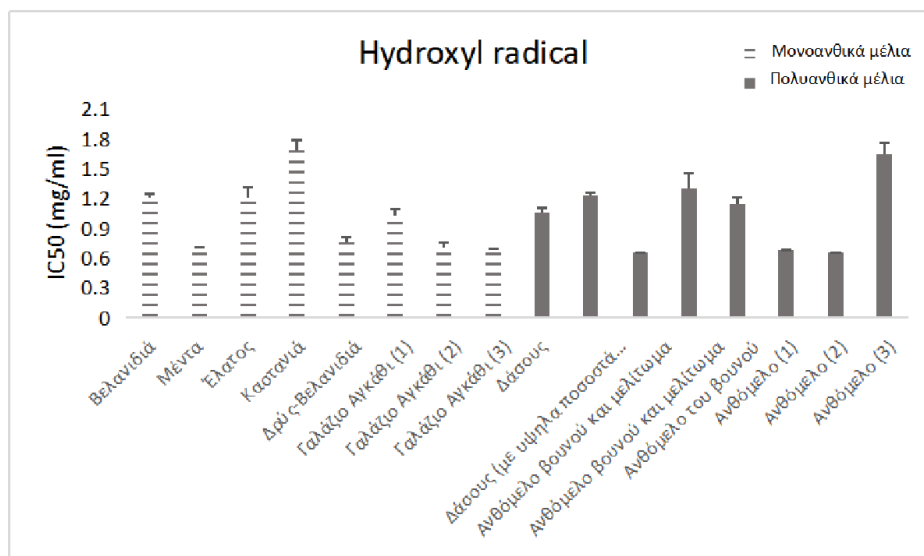
Διάγραμμα 8. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).



Διάγραμμα 7. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου ABTS.

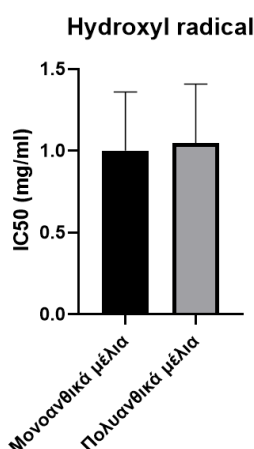
3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης των δειγμάτων μελιού με τη ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}^\bullet$)

Τα αποτελέσματα αναφορικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού για την μέθοδο διερεύνησης της ικανότητας τους να αναστέλλουν την ρίζα υδροξυλίου, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 9. Οι τιμές IC_{50} της παρούσης μεθόδου δεν είχαν μεγάλη διακύμανση, ωστόσο τα Ανθόμελα (1) και (2) είναι αυτά με την χαμηλότερη τιμή IC_{50} , άρα και με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

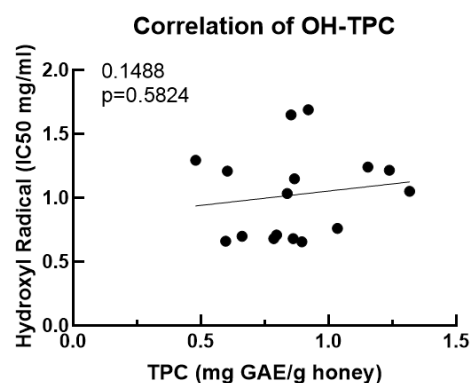


Διάγραμμα 9. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των μελιών με την μέθοδο $\text{OH}^\bullet$.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών δειγμάτων μελιού στα αποτελέσματα της μεθόδου $\text{OH}^\bullet$. Δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση από την ανάλυση αναφορικά με την συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC_{50} της μεθόδου $\text{OH}^\bullet$ και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



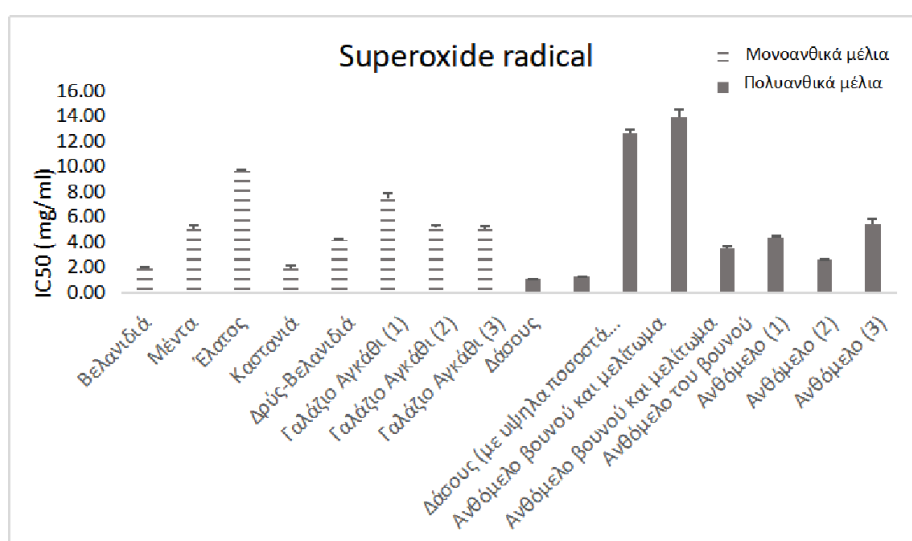
Διάγραμμα 11. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$).



Διάγραμμα 10. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC_{50} της μεθόδου $\text{OH}^\bullet$.

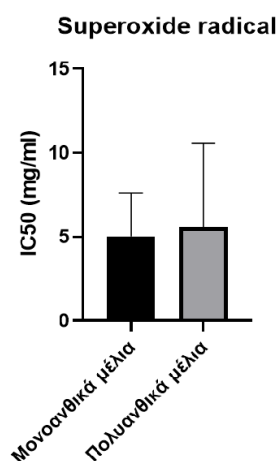
3.2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μελιού μέσω της ικανότητας αλληλεπίδρασης τους με τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$

Τα αποτελέσματα αναφορικά με την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού για την μέθοδο διερεύνησης της ικανότητας τους να αναστέλλουν την δράση της ρίζας σουπεροξειδίου απεικονίζονται στο Διάγραμμα 12. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα Δάσους από την κατηγορία των πολυανθικών και τα δείγματα Καστανιάς και Βελανιδιάς της κατηγορίας των μονοανθικών μελιών είναι αυτά που παρουσιάζουν την υψηλότερη δραστικότητα αφού έχουν τις χαμηλότερες τιμές IC50.

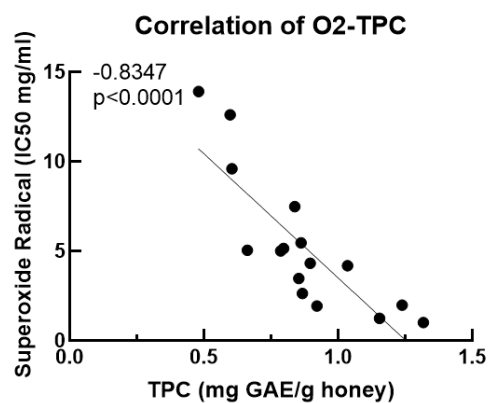


Διάγραμμα 12. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού με την μέθοδο $O_2^{\bullet-}$.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών δειγμάτων μελιού στα αποτελέσματα της μεθόδου $O_2^{\bullet-}$. Ωστόσο σύμφωνα με το Διάγραμμα 12 υπάρχει ισχυρή αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,0001$) μεταξύ των τιμών IC50 της μεθόδου $O_2^{\bullet-}$ και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



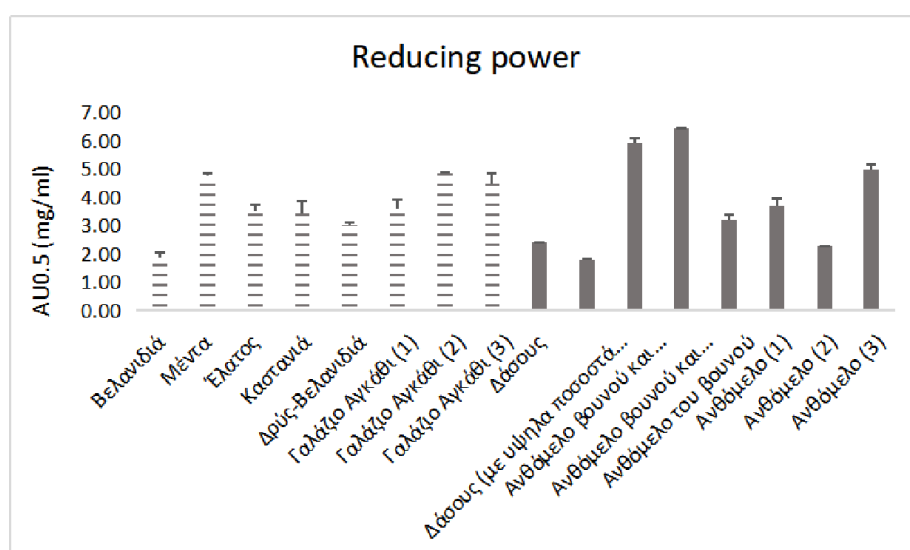
Διάγραμμα 14. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).



Διάγραμμα 13. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 της μεθόδου O2*.

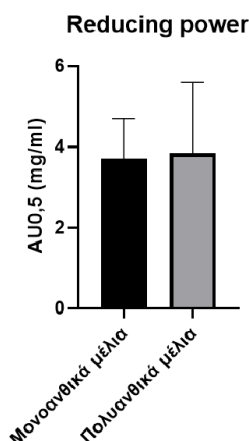
3.2.6 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των προς μελέτη δειγμάτων (Reducing Power)

Η αναγωγική ικανότητα των δειγμάτων μελιού αξιολογήθηκε με την μέθοδο Reducing Power. Τα δείγματα Δάσους από την κατηγορία των πολυανθικών μελιών καθώς και το δείγμα Βελανιδιάς από την κατηγορία των μονοανθικών μελιών είναι αυτά που έδειξαν την υψηλότερη αναγωγική ικανότητα.

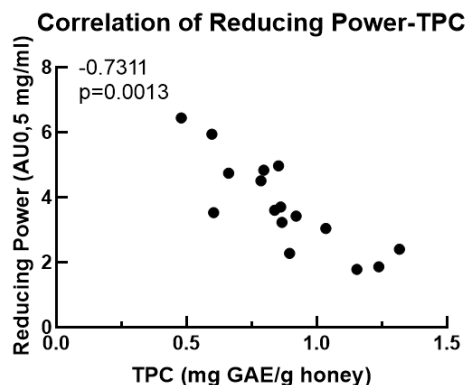


Διάγραμμα 15. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δειγμάτων μελιού ως προς την αναγωγική ικανότητα.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών δειγμάτων μελιού στα αποτελέσματα αξιολόγησης της αναγωγικής ικανότητας. Ωστόσο σύμφωνα με το Διάγραμμα 16 υπάρχει ισχυρή αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0,0013$) μεταξύ των τιμών AU0,5 της μεθόδου Reducing power και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



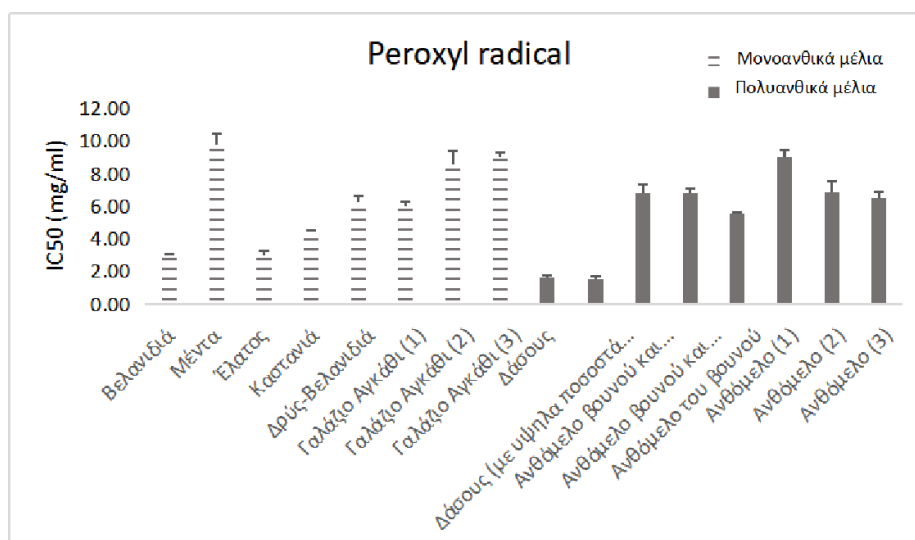
Διάγραμμα 17. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0,05$).



Διάγραμμα 16. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του AU0,5 της μεθόδου Reducing Power.

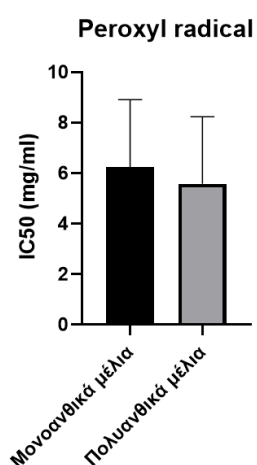
3.2.7 Έλεγχος προστασίας από επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO^{*}) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 16 υπό εξέταση δειγμάτων μελιού απεικονίζονται στο Διάγραμμα 18. Τα δείγματα Δάσους από τη κατηγορία των πολυανθικών μελιών καθώς και τα δείγματα Βελανιδιάς και Ελάτου από την κατηγορία των μονοανθικών μελιών είναι αυτά που έδειξαν την υψηλότερη αντιγονιδιοτοξική ικανότητα.

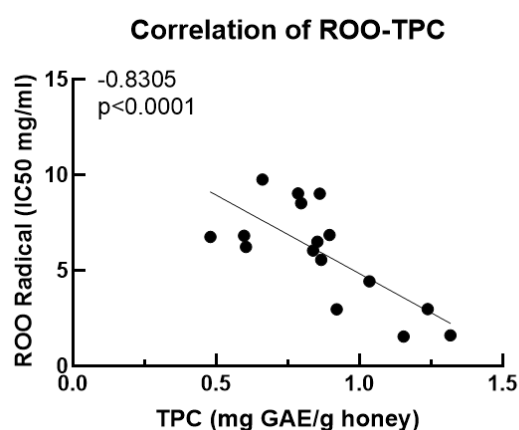


Διάγραμμα 18. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των μελιών ως προς την ικανότητα τους να προστατεύουν το DNA από βλάβες επαγόμενες από ρίζες περοξυλίου.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών δειγμάτων μελιού στα αποτελέσματα αξιολόγησης της αναγωγικής ικανότητας. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0,0013$) μεταξύ των τιμών IC50 της μεθόδου και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου.



Διάγραμμα 19. Συγκριτική ανάλυση των 2 κατηγοριών δειγμάτων μελιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD. * στατιστικώς



Διάγραμμα 20. Συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50.

3.3 Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα του πρώτου αυτού κεφαλαίου προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα για τα μέλια που εξετάσθηκαν στην παρούσα Διατριβή. Συνολικά, τα μέλια Δάσους, Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς και Βελανιδιάς ήταν εκείνα που παρουσίασαν την υψηλότερη δράση έναντι των εξεταζόμενων μεθόδων. Επιπλέον από την ομαδοποίηση και στατιστική ανάλυση μεταξύ μονοανθικών και πολυανθικών δειγμάτων μελιού προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην μέθοδο που εξετάζει την βιολογική δράση των δειγμάτων να αναστέλλουν την τεχνητή ρίζα ABTS. Τέλος, προέκυψε συσχέτιση μεταξύ της βιολογικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων και του πολυφαινολικού τους περιεχομένου.

Όσον αφορά την έρευνα στο πεδίο της διατροφής και της σχέσης της με την υγεία, έχει προκύψει ότι ένα μίγμα διατροφικών πολυφαινολών είναι ικανό για συνεργιστική δράση με θετικά αποτελέσματα για την υγεία ²⁷⁴. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η εντοπιότητα διακατέχει τον σημαντικότερο ρόλο στην τελική σύσταση του μελιού συνεπώς καθορίζει και τις ιδιότητες του ^{234,270,275,276}. Επιπλέον σύμφωνα με μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας παρατηρήθηκε ότι είναι ελλιπής ως προς την έρευνα των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των μελιών της χώρας. Έτσι, σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών που παράγονται στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου.

Στο πρώτο αυτό κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πρώτου επιπέδου αναλύσεων της παρούσας διατριβής, στο οποίο μελετήθηκαν 16 δείγματα μελιού της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου. Συγκεκριμένα, έγινε η ποσοτική εκτίμηση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω 4 μεθόδων που σχετίζονται με την αναστολή της δράσης 2 τεχνητών ελευθέρων ριζών και 2 ριζών, οι οποίες παράγονται ενδογενώς και απαντώνται και στα ανθρώπινα κύτταρα, την αναγωγική ικανότητα η οποία συνδέεται με την αντιοξειδωτική καθώς και την διερεύνηση της ικανότητας των δειγμάτων να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου. Ο συνδυασμός των μεθόδων, πέραν του ποσοτικού προσδιορισμού, θα βοηθήσει στον προσδιορισμό της δραστηριότητας του συνόλου των πολυφαινολών. Πιο συγκεκριμένα αξιολογείται η βιοδραστικότητα των ενώσεων αυτών, κατά πόσο δηλαδή είναι ικανές να προστατεύσουν από οξειδώσεις, καθώς η παρουσία τους δεν

σημαίνει ότι είναι και δραστικές ^{277,278}. Αυτές οι αναλύσεις αποδίδουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την επίδραση που μπορεί να έχει το εξεταζόμενο δείγμα στον οργανισμό.

Στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες μπορεί να συμβάλουν στην γεύση, το χρώμα, το άρωμα και την οξειδωτική σταθερότητα. Στα τέλη του 20ου αιώνα, επιδημιολογικές μελέτες και σχετικές μετα-αναλύσεις έδειξαν ότι η μακροχρόνια κατανάλωση διατροφής πλούσιας σε φυτικές πολυφαινόλες προσφέρει κάποια προστασία από την ανάπτυξη καρκίνου, καρδιαγγειακών νοσημάτων, διαβήτη, οστεοπόρωσης και νευροεκφυλιστικών ασθενειών ^{279,280}. Οι πολυφαινόλες είναι γνωστές για την ευεργετική δράση τους στα βιολογικά συστήματα, ενώ προσδίδουν τις ιδιότητές τους και στο μέλι. Το μέλι είναι ένα σύνθετο μείγμα αποτελούμενο στο μεγαλύτερο ποσοστό του από υδατάνθρακες και πιο συγκεκριμένα σάκχαρα. Η διεθνής βιβλιογραφία έχει αποδείξει την σχέση του με ευεργετικές ιδιότητες μεταξύ των οποίων και η αντιοξειδωτική ικανότητα ^{281–283}. Οι ευεργετικές αυτές ιδιότητες μπορεί να οφείλονται κυρίως σε δευτερεύοντα, βάσει συγκέντρωσης, συστατικά συγκριτικά με τα σάκχαρα. Η πλειονότητα της αντιοξειδωτικής δράσης του μελιού καθορίζεται από τις χημικές ενώσεις του, οι οποίες περιλαμβάνουν φαινόλες, φλαβονοειδή, ένζυμα, οργανικά οξέα, αμινοξέα, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή ²⁸⁴, εκ των οποίων πιο συχνά απαντώνται η χρυσίνη, η καεμφερόλη, η κερκετίνη, η λουτεολίνη, και το γαλλικό οξύ ^{285–288}. Τα μόρια αυτά ανήκουν στις φυτοχημικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται φυσικά στα φυτά και υπάρχουν στο μέλι λόγω της διατροφής της μέλισσας η οποία είναι φυτικής προέλευσης ¹⁶⁹.

Τα δείγματα εξετάσθηκαν αρχικά ως προς το περιεχόμενο τους σε πολυφαινόλες μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος ²⁶⁷. Το μέλι Δάσους είναι αυτό που συνολικά είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, με τιμή 1,317 mg GAE/g μελιού. Στην κατηγορία των μονοανθικών διακρίθηκε το μέλι Βελανιδιάς με τιμή 1,238 mg GAE/g μελιού. Συνολικά δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφοροποιήσεις ως προς το πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάμεσα στις 2 κατηγορίες. Αξίζει να σημειωθεί το αρκετά υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο που παρουσίασε το μέλι δάσους με μελιτώματα (1,154 mg GAE/g μελιού). Τα μέλια με μελιτώματα έχουν διαφορετική σύσταση σχετικά με τα μέλια νέκταρ. Πιο συγκεκριμένα αποτελούνται από λιγότερους μονοσακχαρίτες και περισσότερα σύνθετα σάκχαρα, αμινοξέα, και

πρωτεΐνες. Η διαφοροποίηση αυτή είναι εμφανής και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά ²⁸⁹. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και αφορούσε μέλια της περιοχής της Θεσσαλίας, τα αποτελέσματα του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου διαφοροποιούνται. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν κυρίως πολυανθικά μέλια και το εύρος των τιμών της μεθόδου FC διακυμάνθηκε μεταξύ 0,55 και 0,82 mg GAE/g μελιού ²⁹⁰. Αυτές οι διαφορές είναι πολύ πιθανό να οφείλονται στην τοποθεσία της κυψέλης, άρα στην γεωγραφική θέση της ²⁹¹.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η βιολογική δράση των δειγμάτων μελιού να ανάγουν τις εμπορικά διαθέσιμες ελεύθερες ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}. Το δείγμα που παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση το Δάσους με υψηλά ποσοστά μελιτώματος βελανιδιάς με IC₅₀ 4,615 mg/ml για την μέθοδο DPPH και 0,9 mg/ml για την μέθοδο ABTS. Από τις μετρήσεις προέκυψε πως συγκριτικά με την ρίζα DPPH όλα τα δείγματα μελιού χρειάζονται 4 φορές χαμηλότερη ποσότητα για να εξουδετερώσουν την ρίζα ABTS^{•+} κατά 50%, υποδεικνύοντας άρα πως το μέλι παρουσιάζει υψηλότερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα αυτή. Η διαφορά αυτή ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι μέσω της μεθόδου DPPH[•] ανιχνεύονται μόνο λιπόφιλα μόρια, ενώ μέσω της μεθόδου ABTS^{•+} ανιχνεύονται τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα μόρια. Επίσης, οι δύο ρίζες αλληλοεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τα συστατικά των εξεταζόμενων δειγμάτων λόγω του διαφορετικού τους διαλύτη (μεθανόλη για το DPPH[•] και νερό για το ABTS^{•+}) καθώς και του τρόπου με τον οποίο σχηματίζονται. Πιο συγκεκριμένα, το DPPH[•] είναι μια δραστική, σταθερή ρίζα στην οποία προστίθεται το δείγμα απευθείας ενώ το ABTS^{•+} πρέπει πρώτα να σχηματιστεί και να σταθεροποιηθεί προτού προστεθεί το εξεταζόμενο δείγμα. Και οι δύο αυτές ρίζες δεν παράγονται φυσικά στον οργανισμό αλλά χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα αφού αποτελούν έναν απλό και γρήγορο τρόπο για την αξιολόγηση της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων φυτικής προέλευσης ^{292,293}.

Έπειτα, διερευνήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να εξουδετερώνουν την ρίζα υδροξυλίου (OH[•]). Στην παρούσα διατριβή το σημαντικότερο εύρημα σχετικά με την εν λόγω πειραματική διαδικασία είναι το μικρό εύρος των τιμών IC₅₀ που προέκυψαν. Πιο συγκεκριμένα λόγω του εύρους IC₅₀ 0,65-1,65 mg/ml μελιού μπορούμε να υποθέσουμε ότι η διαφορετική διατροφή των μελισσών και κατ' επέκταση η τελική σύσταση του μελιού δεν διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο. Συμπέρασμα που

προκύπτει από το μεγαλύτερο εύρος των υπολοίπων μεθόδων. Η μέθοδος διερεύνησης της βιολογικής δράσης τους δείγματος να ανάγει την ρίζα υδροξυλίου, ήταν εκείνη όπου τα μέλια στο σύνολό τους παρουσίασαν την υψηλότερη δραστικότητα, ένα πολύ σημαντικό εύρημα λόγω της υψηλής δραστικότητας της όπως αναφέρεται και παραπάνω. Σύμφωνα με ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου του Σαράγιεβο και μελέτη που αφορούσε δείγματα μελιού της Βοσνίας στην οποία διερευνήθηκε η ικανότητα τους να αναστέλλουν την δράση της ρίζας υδροξυλίου, δεν παρατηρήθηκε η ίδια ομοιομορφία στα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα υπήρξε ένα εύρος τιμών της τάξεως των 10 μονάδων, αναλογικά του τύπου μελιού. Επιπλέον συγκριτικά με άλλη εξεταζόμενη μέθοδο που μελετήθηκε και στην παρούσα διατριβή και αφορά την αντιγονιδιοτοξική δράση των δειγμάτων μελιού (ικανότητα προστασίας του πλασμιδιακού DNA από βλάβες προκαλούμενες από ρίζες περοξυλίου), δεν παρατηρήθηκε επίσης τόσο ομοιόμορφη διαφοροποίηση. Πιο συγκεκριμένα, υπήρξαν δείγματα που είχαν είτε υψηλότερη είτε χαμηλότερη τιμή χωρίς να υπάρχει ακριβής αναλογία ²⁹⁴.

Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ παράγεται επίσης φυσικά στον οργανισμό, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, ωστόσο θεωρείται επιβλαβής σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αφού μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση, νέκρωση, και αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο ³⁶. Μελετήθηκε η ικανότητα των μελιών να αναστέλλουν το ανιόν του σουπεροξειδίου, το οποίο συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα τους. Τα δείγματα Δάσους και Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς είναι εκείνα που παρουσίασαν την υψηλότερη ικανότητα αναστολής της ρίζας με τιμές IC50 κοντά στο 1 mg/ml.

Η αναγωγική ισχύς ενός φυτικού δείγματος, σχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική αφού δείγματα με υψηλή αναγωγική ισχύ μπορούν να μειώσουν οξειδωμένα παράγωγα που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Μέσω της μεθόδου reducing power δεν μελετάται η άμεση εξουδετέρωση μιας ελεύθερης ρίζας, αλλά η ικανότητα των δειγμάτων να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή. Η διαδικασία αυτή υποδηλώνει την ικανότητα των δειγμάτων να ενεργούν ως δότες ηλεκτρονίων ²⁹⁵. Τα δείγματα Βελανιδιάς και Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς είναι αυτά που παρουσίασαν ισχυρή αναγωγική ισχύ αφού σημείωσαν την χαμηλότερη τιμή AU0,5. Πρότερη μελέτη έδειξε ότι τα μονοανθικά μέλια είχαν υψηλότερη αναγωγική

ικανότητα, γεγονός που δεν αποδεικνύεται στην παρούσα Διατριβή αφού δεν παρατήρηθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων ²⁹⁶.

Η τελευταία μέθοδος που περιγράφεται σε αυτό το κεφάλαιο των αποτελεσμάτων είναι η ικανότητα των δειγμάτων να προστατεύουν το πλασμιδιακό DNA από μονόκλωνες θραύσεις που προκαλούν ρίζες περοξυλίου (ROO•). Η ικανότητα ενός δείγματος να προστατεύει το DNA από μονόκλωνες ρήξεις, μπορεί να χαρακτηριστεί και ως αντιγονιδιοτιξική λόγω του σημαντικού ρόλου τους στην προώθηση των μεταλλάξεων ²⁹⁷. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποδεικνύουν την αντιγονιδιοτοξική ικανότητα φυτικών δειγμάτων μέσω της αναστολής της δράσης των ριζών που προκαλούν τις θραύσεις σε αυτό ^{260,263,298,299}. Επιπλέον, δείγματα που παρουσιάζουν αντιγονιδιοτοξική δράση πολλές φορές λειτουργούν προστατευτικά και έναντι της λιπιδικής υπεροξείωσης αφού οι ρίζες περοξυλίου είναι από τις κύριες υπαίτιες για την οξείδωση των λιπιδίων ⁴⁹. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα Δάσους και Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς παρουσίασαν την υψηλότερη αντιγονιδιοτοξική δράση, αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με δημοσιευμένη μελέτη που αναφέρει ότι μέλια δασικής περιοχής ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι της ρίζας περοξυλίου σε σύγκριση με μονοανθικά μέλια όπως αυτό της Καστανιάς ²⁹⁴.

Στο πρώτο αυτό στάδιο της Διδακτορικής Διατριβής έγινε μια *in vitro* αξιολόγηση των δειγμάτων της μελέτης με σκοπό την αξιολόγηση και κατάταξή τους (screening) ανά κατηγορία. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε 2 βασικές κατηγορίες (μονοανθικά και πολυανθικά) όπως περιγράφεται παραπάνω, μεταξύ των οποίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε όλες τις μεθόδους με σκοπό να εντοπισθούν πιθανές στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 κατηγοριών. Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά= σημαντική διαφορά μόνο στην μέθοδο διερεύνησης της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν την εμπορικά διαθέσιμη ρίζα ABTS⁺, με τα πολυανθικά μέλια να υπερέχουν.

Επιπλέον, έγινε συσχέτιση του συνολικού περιεχομένου με τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων. Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας αλλά και μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τα προηγούμενα χρόνια στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών και την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μελιού ^{110,270,300,301204,302}. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση υπάρχει αρνητική συσχέτιση

μεταξύ του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και της μεθόδου αναστολής του $O_2^{\cdot -}$ ($p < 0.0001$), της αναγωγικής ισχύος ($p = 0.0013$) και της αντιγονιδιοτοξικής δράσης ($p < 0.0001$). Ειδικότερα, αυτή η αρνητική συσχέτιση σημαίνει ότι όσο υψηλότερο είναι το πολυφαινολικό περιεχόμενο τόσο χαμηλότερες είναι οι τιμές IC50 και AU0,5 επομένως τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα των συγκεκριμένων ενώσεων, παρά το γεγονός ότι στο μέλι βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις ($< 1\%$)³⁰³.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι δοκιμασίες χωρίς κύτταρα που περιγράφονται παραπάνω παρέχουν συμπληρωματικά πληροφορίες για την βιολογική δράση των αντιοξειδωτικών που εντοπίζονται στα δείγματα μελιού. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε κύτταρα, καθώς κρίσιμες πτυχές της χρήσης τους θα μπορούσαν να αποφέρουν πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες για τη δραστηριότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων μας σε απλουστευμένα βιολογικά συστήματα, όπως οι κυτταρικές καλλιέργειες. Για τον λόγο αυτό από το παρόν κεφάλαιο επιλέχθηκαν 6 δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν περαιτέρω σε επίπεδο κυτταροκαλλιιεργειών.

4. *In vitro* cell-based ανάλυση των μελιών

Η καλλιέργεια κυττάρων είναι ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που χρησιμοποιούνται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία, παρέχοντας άριστα πρότυπα συστήματα για τη μελέτη της φυσιολογίας και της βιοχημείας των κυττάρων (π.χ. μεταβολικές μελέτες, γήρανση κ.α.), τις επιδράσεις των φαρμάκων και των τοξικών ενώσεων στα κύτταρα, καθώς και τη μεταλλαξιγένεση και την καρκινογένεση ³⁰⁴. Υπάρχει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον όσον αφορά τις κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις των φυσικών προϊόντων όπως το μέλι σε *in vivo-like* συστήματα και πιο συγκεκριμένα σε περιβάλλον κυτταροκαλλιέργειας έναντι του οξειδωτικού στρες, με στόχο την ανακάλυψη πιθανών θεραπευτικών και χημειοπροληπτικών παραγόντων. Τόσο οι φυσιολογικές όσο και οι καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι αρκετά χρήσιμα εργαλεία προκειμένου να εξεταστεί μηχανιστικά η ικανότητα των φυτικών δειγμάτων να μεταβάλλουν τον πολλαπλασιασμό και την οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων ²⁵⁴.

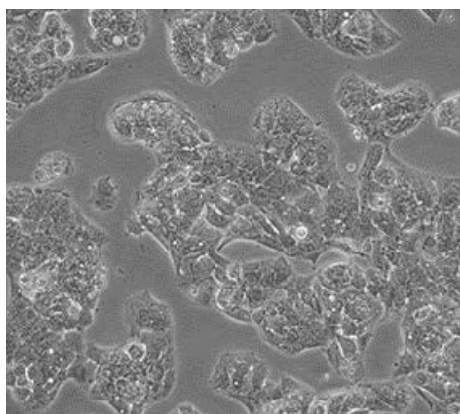
4.1 Υλικά και μέθοδοι της *in vitro* cell-based ανάλυσης

Για την περαιτέρω ανάλυσή τους επιλέχθηκαν 6 δείγματα μελιού. Τα κριτήρια επιλογής ήταν η κατηγορία στην οποία ανήκουν και η αξιολόγηση των *in vitro* cell-free μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν 2 δείγματα από την κατηγορία των μονοανθικών και 4 από την κατηγορία των πολυανθικών μελιών η οποία διαχωρίστηκε σε 2 επιμέρους κατηγορίες. Τα πολυανθικά μέλια διαχωρίστηκαν σε Ανθόμελα και μέλια Δάσους. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε καθώς πρόκειται για δύο διαφορετικές κατηγορίες προϊόντων. Ειδικότερα, όταν ένα μέλι χαρακτηρίζεται σαν μέλι Δάσους σημαίνει ότι η μέλισσα έχει τραφεί από διαφορετικά φυτά συγκριτικά με τα κοινά ανθόμελα, αφού η ονομασία «δάσος» παραπέμπει σε φυτά που βρίσκονται σε υψόμετρο άνω των 700 μέτρων (ορεινές-ημιορεινές περιοχές) όπου η βιοποικιλότητα είναι διαφορετική συγκριτικά με μια πεδινή περιοχή. Αυτό συμβαίνει λόγω των κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές ¹⁴³. Το μοναδικό μέλι το οποίο επιλέχθηκε με διαφορετικό κριτήριο είναι το Γαλάζιο Αγκάθι. Πρόκειται για μια σπάνια πόα που απαντάται σε χαράδρες και δύσβατα σημεία σε

συγκεκριμένα σημεία της χώρας και ελκύει ιδιαίτερος τις μέλισσες. Έχει έντονη γεύση και αρώματα, για αυτό και προσελκύει μελισσοκόμους και καταναλωτές. Λόγω της σπανιότητάς του, παράγεται σε περιορισμένες ποσότητες³⁰⁵. Τα μέλια που επιλέχθηκαν είναι: Βελανιδιάς, Γαλάζιο αγκάθι (1), Δάσους, Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς, Ανθόμελο (1) και Ανθόμελο (2).

Στην παρούσα Διατριβή εξετάσθηκαν 3 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα:

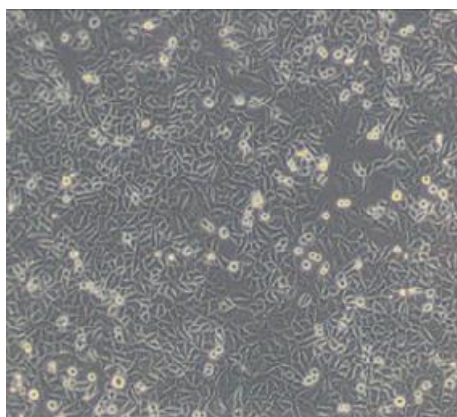
HepG2: ανθρώπινη καρκινική ηπατική κυτταρική σειρά (Εικόνα 38), προέρχεται από



Εικόνα 38. HepG2. Ανθρώπινα καρκινικά ηπατικά κύτταρα.

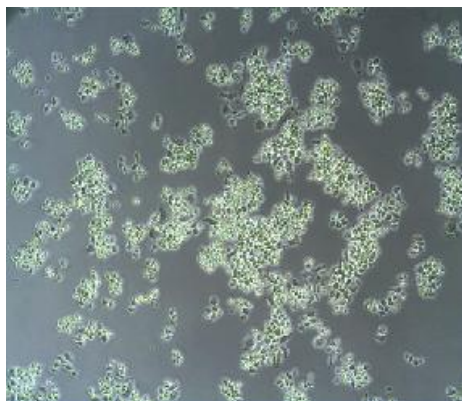
15χρονο έφηβο, με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Πρόκειται για μορφολογικά επιθηλιακά κύτταρα, με τυπικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Έχουν αποτελέσει μοντέλο τόσο για βιοχημικές όσο και για διατροφικές μελέτες, ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως και σε μελέτες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του ήπατος και την τοξικότητα των ξеноβιοτικών, την διερεύνηση περιβαλλοντικών και διαιτητικών κυτταροτοξικών παραγόντων,

τον προσδιορισμό της ηπατοκαρκινογένεσης και την μελέτη για την εύρεση φαρμάκων στόχων αυτής, αφού έχουν την ικανότητα να διατηρούν την μορφολογία και αρκετές από τις λειτουργίες των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων^{306–308}.



Εικόνα 39. MKN45. Ανθρώπινη καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά.

MKN45: πρόκειται για κύτταρα από διαφοροποιημένο ανθρώπινο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα 62χρονης γυναίκας με καταγωγή από την Ιαπωνία. Μορφολογικά, τα κύτταρα είναι στρογγυλά, σε σχήμα ωοειδές ή ατράκτου. Ορισμένες φορές έχουν παρατηρηθεί και κόκκοι βλέννας, συσσωματώματα γλυκογόνου αλλά και μικρολάχνες στην ελεύθερη τους επιφάνεια³⁰⁹.



Εικόνα 40. RAW264.7. Καρκινική σειρά
μακροφάγων κυττάρων ποντικού

RAW264.7: πρόκειται για σειρά μακροφάγων που απομονώθηκε από το ασκитικό υγρό αρσενικών ποντικών με όγκο που προκλήθηκε από τον ιό της λευχαιμίας ποντικού Abelson. Αποτελούν βασικό σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών αποκρίσεων σε παθογόνα, της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης. Είναι καλά χαρακτηρισμένη αναφορικά με τις

μεσολαβούμενες από τα μακροφάγα ανοσοποιητικές, μεταβολικές και φαγοκυτταρικές λειτουργίες ³¹⁰.

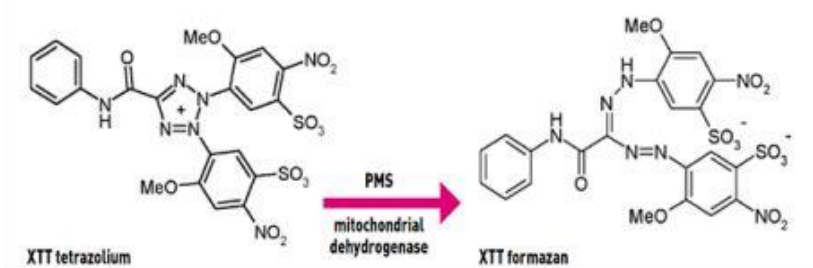
Συνθήκες καλλιέργειας

Το σύνολο των κυτταρικών σειρών αναπτύχθηκε σε φλάσκες εμβαδού 25 ή 75 cm² σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και σταθερή συγκέντρωση CO₂ 5%. Για τις κυτταρικές σειρές HepG2 και RAW264.7 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), το οποίο εμπεριέχει ορό βοδινού (FBS, 10% v/v), 2 mM L-γλουταμίνη και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης. Για την κυτταρική σειρά MKN45 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο Roswell Park Memorial Institute (RPMI), το οποίο εμπεριείχε ορό βοδινού (FBS, 10% v/v), και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης. Τα κύτταρα των σειρών HepG2 και MKN45 επώαστηκαν ώστε να καλύψουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας και έπειτα ανακαλλιεργούνταν με την διαδικασία της θρυψινοποίησης. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο θρυψίνη (0,25 %) το οποίο διαχωρίζει τους δεσμούς των κυττάρων από την φλάσκα φέρνοντάς τα στο αιώρημα ³¹¹. Ακολουθούσε η προσθήκη πλήρους θρεπτικού για την αναστολή λειτουργίας του ενζύμου και τέλος η μεταφορά ποσότητας αιωρήματος σε νέα φλάσκα με νέο θρεπτικό μέσο. Για την κυτταρική σειρά RAW264.7 ακολουθήθηκε διαδικασία απόξεσης σε φρέσκο θρεπτικό μέσο και έπειτα η μεταφορά ποσότητας αιωρήματος σε νέα φλάσκα. Όλες οι διεργασίες που περιεγράφηκαν ήδη αλλά και αυτές που θα ακολουθήσουν και αφορούν τον χειρισμό

των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ρεύματος καθέτου νηματικής ροής, επιπέδου βιοασφάλειας 2. Οι κυτταρικές σειρές καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων υπόκεινται σε έλεγχο για επιμόλυνση μυκοπλάσματος με PCR.

4.1.1 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων μελιού με τη μέθοδο ΧΤΤ

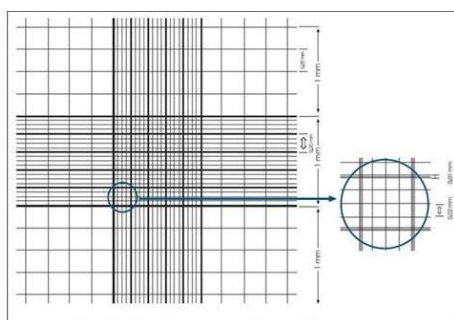
Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμεωνιακού άλατος (ΧΤΤ) στην αντίστοιχη φορμαζάνη μέσω των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των μεταβολικών ενεργών κυττάρων (Εικόνα 41). Η φορμαζάνη είναι πορτοκαλί χρώσης και απορροφά στα 450 nm ¹¹². Με την προσθήκη δείγματος σε κυτταροτοξική συγκέντρωση η οπτική απορρόφηση μειώνεται, γεγονός που προκύπτει από την μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ²⁵⁴.



Εικόνα 41. Μετατροπή του τετραμμεωνιακού άλατος (ΧΤΤ) στην αντίστοιχη φορμαζάνη.

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν είτε με την χρήση θρυψίνης είτε με απόξεση, αναλογικά



Εικόνα 42. Πλάκα Neubauer.

του είδους της κυτταρικής σειράς και μια ποσότητα ίση με 10 μl μεταφέρθηκε σε πλάκα Neubauer τοποθετημένη σε μικροσκόπιο με σκοπό την μέτρησή τους (Εικόνα 42). Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία απαιτείται η χρήση πλάκας 96 θέσεων, όπου στην κάθε θέση επιστρώθηκαν 10.000 κύτταρα.

Με το πέρας της μέτρησης των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα της πλάκας Neubauer υπολογίστηκε ο μέσος αυτών ο οποίος στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με το 10.000 ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχονται στο 1 ml. Τέλος, υπολογίστηκε η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που χρειάζεται για τον

απαιτούμενο αριθμό των 10.000 κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώασθηκαν για 24 ώρες στους 37°C και σε συγκέντρωση CO₂ 5%. Με το πέρας των 24 ωρών, ακολούθησε απομάκρυνση του πλήρους θρεπτικού και αντικατάστασή του με θρεπτικό χωρίς την παρουσία FBS και το εξεταζόμενο δείγμα σε διάφορες συγκεντρώσεις (η επεξεργασία του δείγματος έγινε με τον τρόπο που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 760) ακολουθούμενο από επώαση 24 ωρών. Ακολούθησε η προσθήκη του αντιδραστηρίου XTT (49 μl αντιδραστήριο σήμανσης XTT και 1 μl ενεργοποιητή XTT) και νέα επώαση 4 ωρών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm με τη χρήση αναγνώστη πλάκας (Bio-Tek ELx800; Bio-Tek instruments, inc.). Επιπλέον αξιολογήθηκε η απορρόφηση κάθε προς εξέταση συγκέντρωσης μελιού απουσία κυττάρων (τιμή αναφοράς) καθώς και η απορρόφηση των κυττάρων απουσία δείγματος μελιού (θετικός μάρτυρας).

Υπολογισμοί

Οι τιμές αναφοράς αφαιρέθηκαν από τις τιμές της αντίστοιχης συγκέντρωσης μελιού και η μεταβολή της βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίστηκε ως εξής:

όπου Abs = οπτική απορρόφηση:

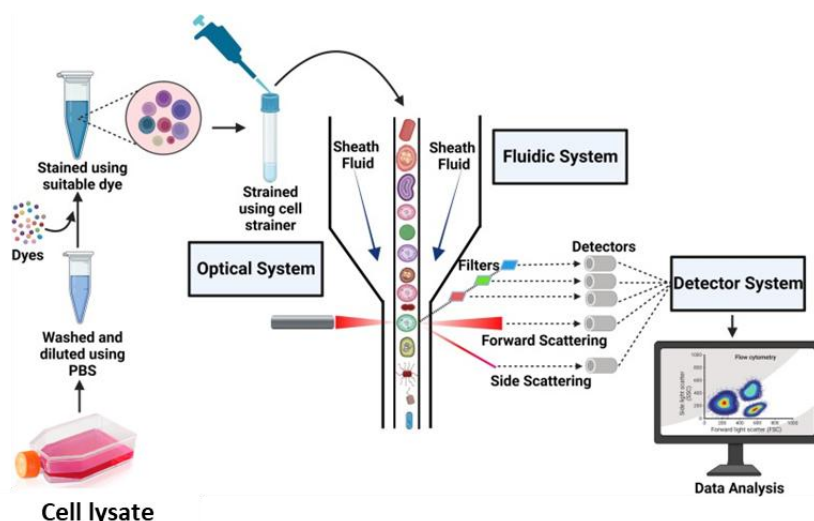
$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = [(Abs \text{ μάρτυρα} - Abs \text{ δείγματος}) / Abs \text{ μάρτυρα}] \times 100$$

4.1.2 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων GSH και ROS με την χρήση κυτταρομετρίας ροής

Με την συγκεκριμένη μέθοδο μπορούν να αξιολογηθούν κύτταρα μεγέθους 0,5-50μm καθώς διέρχονται από ακτίνες φωτός. Η αξιολόγηση μπορεί να αφορά χαρακτηριστικά όπως η εσωτερική πολυπλοκότητα, το μέγεθος καθώς και η ένταση φθορισμού. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση τα κύτταρα θα πρέπει να βρίσκονται σε μορφή αιωρήματος (Εικόνα 43).

Για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Thiol Green Dye, και για τις ROS η διοξική 2',7'-

διγλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H2DCFDA). Η H2DCFDA, εισέρχεται στο κύτταρο με διάχυση όπου και αποακετυλιώνεται σχηματίζοντας προϊόν με όνομα 2',7'-διγλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H2DCF) του οποίου το φάσμα διέγερσης είναι τα 488 και 530 nm. Η Thiol Green έχει την ικανότητα να ανιχνεύει και να αλληλοεπιδρά με θειολικές ενώσεις παράγοντας προϊόν πράσινης απόχρωσης του οποίου το φάσμα διέγερσης είναι τα 490 και 525 nm.



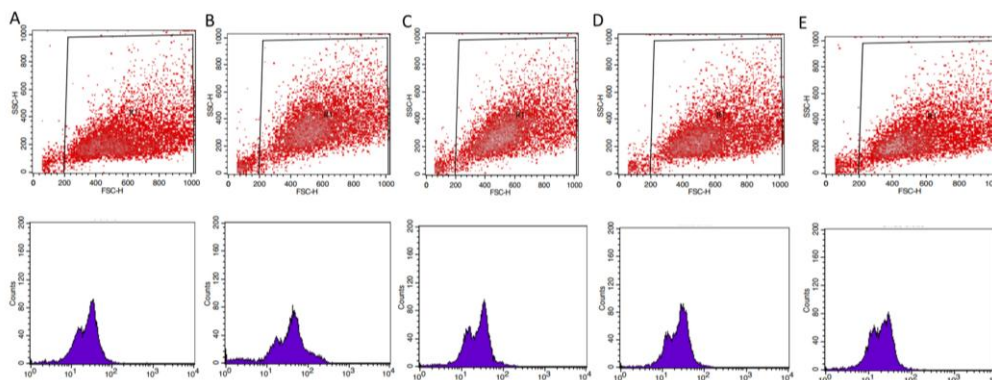
Εικόνα 43. Κυτταρομετρία ροής.

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν είτε με την χρήση θρυψίνης είτε με απόξεση, αναλογικά του είδους της κυτταρικής σειράς και μια ποσότητα ίση με 10 μ l μεταφέρθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) τοποθετημένη σε μικροσκόπιο με σκοπό την μέτρησή τους (Εικόνα 42). Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία απαιτείται η χρήση πλάκας 6 θέσεων, όπου στην κάθε θέση επιστρώθηκαν 300.000 κύτταρα. Με το πέρας της μέτρησης των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα της πλάκας Neubauer υπολογίσθηκε ο μέσος όρος αυτών ο οποίος στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με το 10.000 ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχονται στο 1 ml. Τέλος, υπολογίσθηκε η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που χρειάζεται για τον απαιτούμενο αριθμό των 300.000 κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώασθηκαν για 24 ώρες στους 37°C και σε

συγκέντρωση CO₂ 5%. Με το πέρας των 24 ωρών, ακολούθησε απομάκρυνση του πλήρους θρεπτικού και αντικατάστασή του με θρεπτικό χωρίς την παρουσία FBS και το εξεταζόμενο δείγμα στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (η επεξεργασία του δείγματος έγινε με τον τρόπο που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 760) ακολουθούμενο από επώαση 24 ωρών.

Την ημέρα του πειράματος, προστέθηκαν 250 μl θρυψίνης/θέση και οι πλάκες επώαστηκαν για 1' στον κλίβανο. Έγινε επαναϊώρηση με την προσθήκη 1 ml πλήρους θρεπτικού (δηλαδή με FBS), και μεταφορά σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 1,5 ml, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (1500 g, 5 λεπτά, 4°C), απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml PBS, διαλυτοποίηση και επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρωσης. Αφού αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο, προστέθηκαν οι χρωστικές και, οι αντιδράσεις στις οποίες προστέθηκε Thiol green (σε συγκέντρωση 125 μM στην αντίδραση) επώαστηκαν στον κλίβανο για 30 λεπτά με ανάδευση ανά 10 λεπτά, ενώ εκείνες στις οποίες προστέθηκε H2DCFDA (σε συγκέντρωση 10 μM στην αντίδραση) επώαστηκαν για 45' με ανάδευση ανά 10 λεπτά στον κλίβανο. Συνεχίζοντας και για τις δύο περιπτώσεις, ακολούθησε φυγοκέντρωση (1500 g, 5 λεπτά, 4°C), αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, έγινε προσθήκη 500 μl PBS και διαλυτοποίηση του ιζήματος. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια κυτταρομέτρου και τοποθετήθηκαν στον πάγο μέχρι να ξεκινήσει η ανάλυσή τους. 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 περίπου 300 κύτταρα/δευτερόλεπτο ενώ η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αξιολογήθηκαν με τη χρήση του BD Cell Quest 6.0 (BD Biosciences) ²⁷⁰.



Εικόνα 44. Παράδειγμα διαγραμμάτων διασποράς και ιστογράμματα όπως προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής. Τα διαγράμματα είναι αντιπροσωπευτικά ενός δείγματος μελιού (Α) ομάδα ελέγχου, (Β) 25 mg/ml, (C) 12,5 mg/ml, (D) 6,25 mg/ml και (Ε) 3,125 mg/ml.

4.1.3 Προσδιορισμός της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρικές μεθόδους

Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν είτε με την χρήση θρυψίνης είτε με απόξεση, αναλογικά του είδους της κυτταρικής σειράς και μια ποσότητα ίση με 10 μ l μεταφέρθηκε σε πλάκα Neubauer τοποθετημένη σε μικροσκόπιο με σκοπό την μέτρησή τους (Εικόνα 41). Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία απαιτείται η χρήση φλάσκας T75 cm^2 , όπου επιστρώθηκαν 1.500.000 κύτταρα. Με το πέρας της μέτρησης των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα της πλάκας Neubauer υπολογίστηκε ο μέσος αυτών ο οποίος στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με το 10.000 ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχονται στο 1 ml. Τέλος, υπολογίστηκε η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που χρειάζεται για τον απαιτούμενο αριθμό των 1.500.000 κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώασθηκαν για 24 ώρες στους 37°C και σε συγκέντρωση CO₂ 5%. Με το πέρας των 24 ωρών, ακολούθησε απομάκρυνση του πλήρους θρεπτικού και αντικατάστασή του με θρεπτικό χωρίς την παρουσία FBS και το εξεταζόμενο δείγμα στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις (η επεξεργασία του δείγματος έγινε με τον τρόπο που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 760) ακολουθούμενο από επώαση 24 ωρών. Με την λήξη των 24 ωρών τα κύτταρα και αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο έγινε προσθήκη 0,5 ml PBS με αναστολείς πρωτεασών και απόξεση των κυττάρων από την φλάσκα. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια όγκου 1,5 ml όπου και υποβλήθηκαν σε υπερήχους. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία περιλάμβανε 5 επαναλήψεις από 10'' εφαρμογή υπερήχων

σε συνθήκες: πλάτος κύματος : 70% + παλμός: 0,7 δευτερόλεπτα, και 10'' παύση. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρωση (4°C για 20 λεπτά στα 15000g), λήψη του υπερκλειμένου και αποθήκευση του στους -80°C μέχρι την ημέρα του πειράματος ²⁷⁰.

4.1.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Bradford, για την παρασκευή του οποίου έγινε χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, η οποία όταν έρχεται σε επαφή με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών σχηματίζει προϊόν μπλέ χρώσης που απορροφά στα 595 nm ³¹².

Πειραματική διαδικασία

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). Την ανάδευση με απιονισμένο νερό ακολούθησε φιλτράρισμα, ενώ τέλος έγινε εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου με σκοπό την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης.

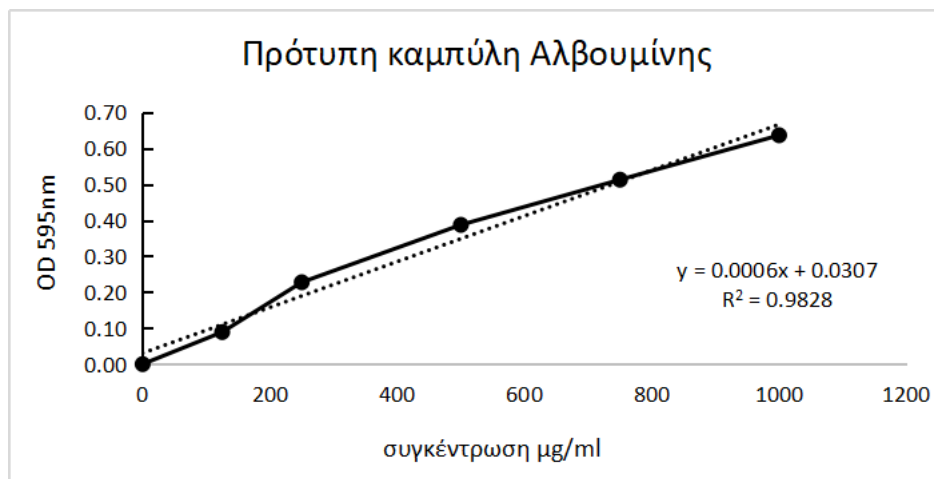
Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν με την σειρά που αναγράφονται στον Πίνακα 12 ακολουθούμενα από επώαση 15' στο σκοτάδι και τελικά μέτρηση στα 595 nm.

Πίνακας 12. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Δείγμα
Κυτταρόλυμα (Αραίωση 1/5 σε PBS)	-	20 µl
PBS	20 µl	-
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml

Υπολογισμοί

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 21. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης.

4.1.5 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

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 (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm³¹³.

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 1,5 ml προστίθενται τα αντιδραστήρια με την σειρά και σε ποσότητες όπως αυτές αναφέρονται στον Πίνακα 13. Το x αποτελεί τον όγκο του κυτταρολύματος που χρειάζεται για συγκέντρωση πρωτεΐνης ίση με 40 μg (από τους υπολογισμούς της μεθόδου Bradford). Αφού τα δείγματα επωαστούν για 1 ώρα στο σκοτάδι ακολουθεί φυγκονέκτρηση για 3', σε θερμοκρασία δωματίου στα 15000g και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm.

Πίνακας 13. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο TAC.

	Τυφλό	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM, pH = 7.4)	500 μl	500-x μl
Διάλυμα ρίζας DPPH [•] (0.1 mM)	500 μl	500 μl
Κυτταρόλυμα	-	x μl
Ντελ	1 ml	

Υπολογισμοί

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

- % Abs μείωση $[(\text{AbsControl} - \text{AbsΔείγματος}) / \text{AbsControl}] * 100$
- η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα 50 μmol / L κυψελίδας

4.1.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Είναι σύνηθες στο κυτταρικό περιβάλλον και σε κατάσταση οξειδωτικού στρες να σχηματίζονται ενεργά και ασταθή υπεροξειδία λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παράγοντας ασταθές προϊόν, την μαλονδιαλδεϋδη. Τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεϋδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεϋδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ $\frac{1}{2}$ ³¹⁴.

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 15ml προστίθενται x μl κυτταρολύματος (x ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει 80 μg συνολικής πρωτεΐνης) και 400-x μl PBS ενώ στο τυφλό προστίθενται 400 μl PBS. Στην συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mM, pH 7.4) σε όγκο 500 μl και TCA 35% σε όγκο 500 μl. Τα δείγματα ανδεύονται και επωάζονται για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού προστεθεί 1 ml διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM) τα δείγματα τοποθετούνται για 45' σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 95°C. Με την ολοκλήρωση της επώασης, ακολουθεί νέα

σε πάγο για 5'. Έπειτα προστίθεται διάλυμα TCA 70% σε όγκο 1 ml, ακολουθούμενο από ανάδευση. Τέλος, μεταφέρεται 1 ml από την αντίδραση σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 1,5ml και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3' σε θερμοκρασία δωματίου στα 11200 g. Η οπτική απορρόφηση μετράται στα 530 nm.

Υπολογισμοί

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

- 0,156 συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA
- % Abs μείωση $[(\text{AbsControl}-\text{AbsΔείγματος})/\text{AbsControl}] * 100$

4.1.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία σε βλάβες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες. Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αξιόπιστο δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών αφού η καρβονυλίωση είναι μη αναστρέψιμη βλάβη, καθιστώντας τα καρβονύλια σταθερά μόρια. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες όταν υποστούν βλάβες δεν έχουν την ικανότητα να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου) ³¹².

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες 1,5 ml προστέθηκαν x μl κυτταρολύματος (όπου x ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει 80 μg συνολικής πρωτεΐνης) και 400-x μl PBS. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl DNPH (14 mM) για τα δείγματα και 500 μl HCL (2.5N) για τα τυφλά (σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί ένα τυφλό). Έπειτα πραγματοποιήθηκε επώαση 1 ώρας στο σκοτάδι, με ενδιάμεσες αναδεύσεις κάθε 15'. Την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5' στους 4°C στα 15000 g, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 ml TCA 10%. Έπειτα πραγματοποιήθηκε νέα

φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες ακολουθούμενη από απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 900 μl διαλύματος (1:1 v/v) αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα). Έγινε επανάληψη αυτού του βήματος 3 φορές. Μετά την 3^η πλύση, προστέθηκε 1 ml ουρίας (5M, pH=2.3) και επώαση για 15' στους 37°C και επανάληψη της φυγοκέντρωσης. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol / ml) = $[(\text{Abs}\Delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma - \text{Abs}\text{Τυφλ}\acute{\omicron}\varsigma) / 0,022 * (1000/X)]$.

- 0,022 μοριακός συντελεστής απόσβεσης του DNPH
- % Abs μείωση $[(\text{AbsControl} - \text{Abs}\Delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) / \text{AbsControl}] * 100$

4.1.8 Στατιστική ανάλυση

Το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της μέσης τιμής κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος οίνου με τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) και σημαντικές θεωρούνται οι διαφορές $p \leq 0,05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism έκδοση 9 για MAC OS, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

4.2 Αποτελέσματα

4.2.1 Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας (ΧΤΤ)

Στον Πίνακα 14 αναγράφεται η μικρότερη κυτταροτοξική συγκέντρωση για το κάθε δείγμα ανά κυτταρική σειρά. Οι συγκεντρώσεις του πίνακα δεν χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, καθώς εκείνη αφορά μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται να υπάρχει μια σχετική ομοιομορφία αναφορικά με τις κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, ωστόσο η ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 φαίνεται να παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία αφού σε ορισμένες περιπτώσεις η υποτριπλάσια συγκέντρωση οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

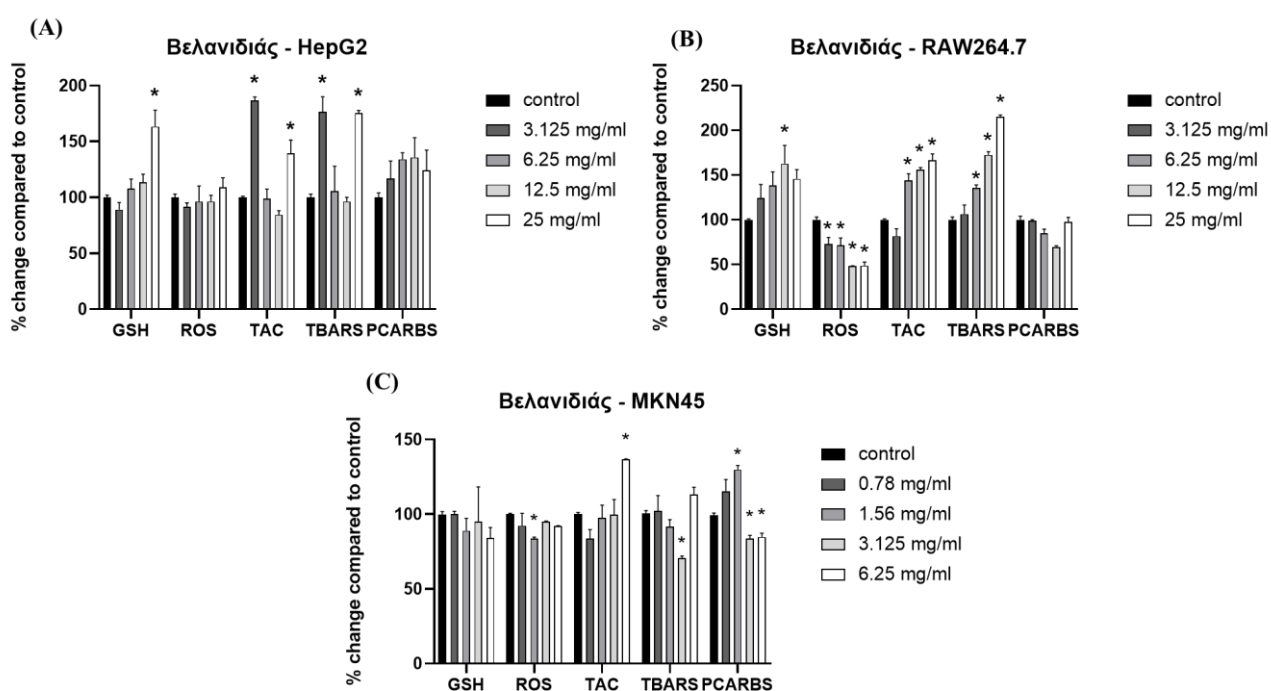
Πίνακας 14. Αποτελέσματα μεθόδου ΧΤΤ.

Δείγμα	Κυτταροτοξική συγκέντρωση (mg/ml)		
	HepG2	RAW264.7	MKN45
Βελανιδιά	50	50	12,5
Γαλάζιο Αγκάθι (2)	50	50	50
Δάσους	25	50	25
Δάσους με μελτώματα βελανιδιάς	50	25	12,5
Ανθόμελο (1)	50	12,5	12,5
Ανθόμελο (2)	25	25	25

4.2.2 Αποτελέσματα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης ανά δείγμα μελιού

Στο Διάγραμμα 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μέλι βελανιδιάς, που αφορά όλες τις μεθόδους συνολικά ανά κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις 3,125-25mg/mL για 24 ώρες και ακολούθησε η

πειραματική διαδικασία για κάθε μέθοδο, όπως περιγράφεται πιο πάνω. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, προκύπτει ότι το μέλι βελανιδιάς αύξησε την GSH στις δύο από τις τρεις κυτταρικές σειρές (HepG2, Raw264.7) και μείωσε ταυτόχρονα τα ROS μόνο στα μακροφάγα κύτταρα. Όσον αφορά τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), παρατηρήθηκε αύξηση και στις τρεις κυτταρικές σειρές στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μελιού, ωστόσο ενδιαφέρουσα είναι η αύξηση στην μικρότερη συγκέντρωση μελιού στην κυτταρική σειρά HepG2. Όσον αφορά τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης, στα HepG2 παρατηρήθηκε όμοιο μοτίβο μεταβολής όπως και στην TAC, ενώ στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε μόνο στα MKN45. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων φαίνεται να επηρεάστηκαν μόνο στην σειρά MKN45, με τρόπο δόσοεξαρτώμενο.

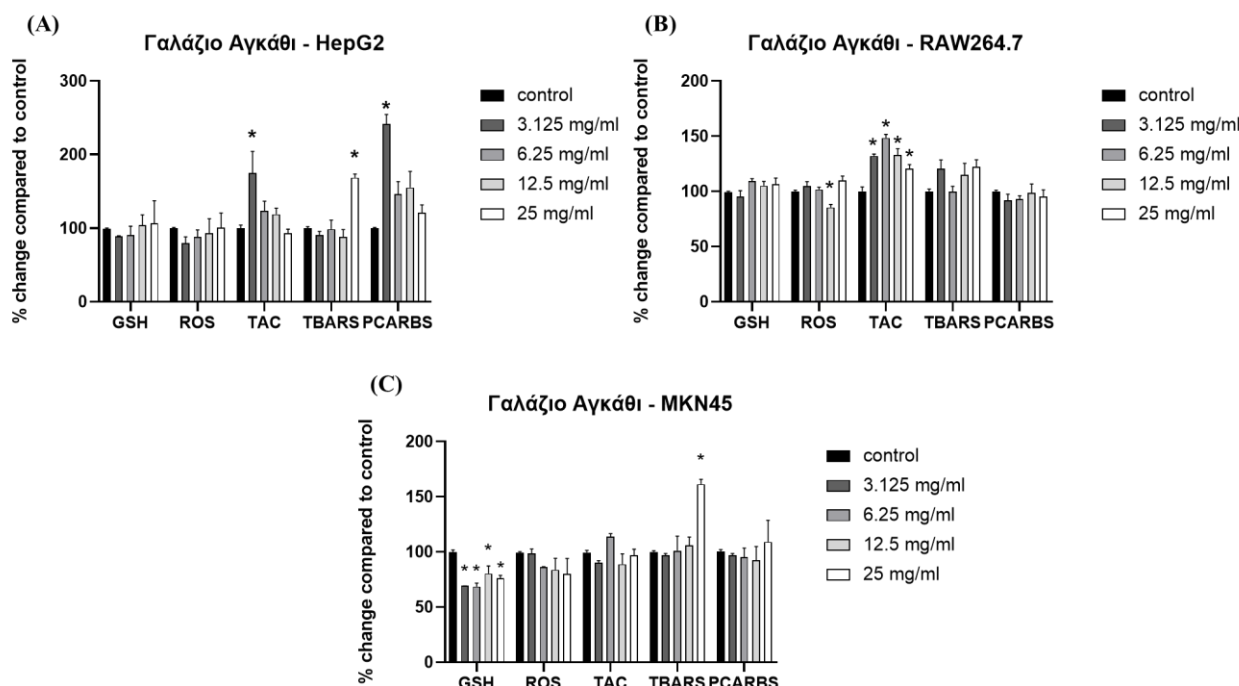


Διάγραμμα 22. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Βελανιδιάς σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (Α) κυτταρική σειρά HepG2, (Β) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

Παρόμοια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και για το μέλι Γαλάζιο αγκάθι (1) και στο [Διάγραμμα 23](#) απεικονίζονται τα αποτελέσματα. Από τις μετρήσεις των βιοδεικτών μέσω φασματοφωτομετρίας προέκυψαν κυρίως μεμονωμένα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Εξαίρεση σε αυτό

το μοτίβο αποτελεί η κυτταρική σειρά RAW264.7 και συγκεκριμένα ο δείκτης TAC, του οποίου το εξεταζόμενο μέλι αύξησε τα επίπεδα στατιστικώς σημαντικά σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το μέλι Γαλάζιο αγκάθι μείωσε στατιστικώς σημαντικά τα ενδογενή επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά MKN45 σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

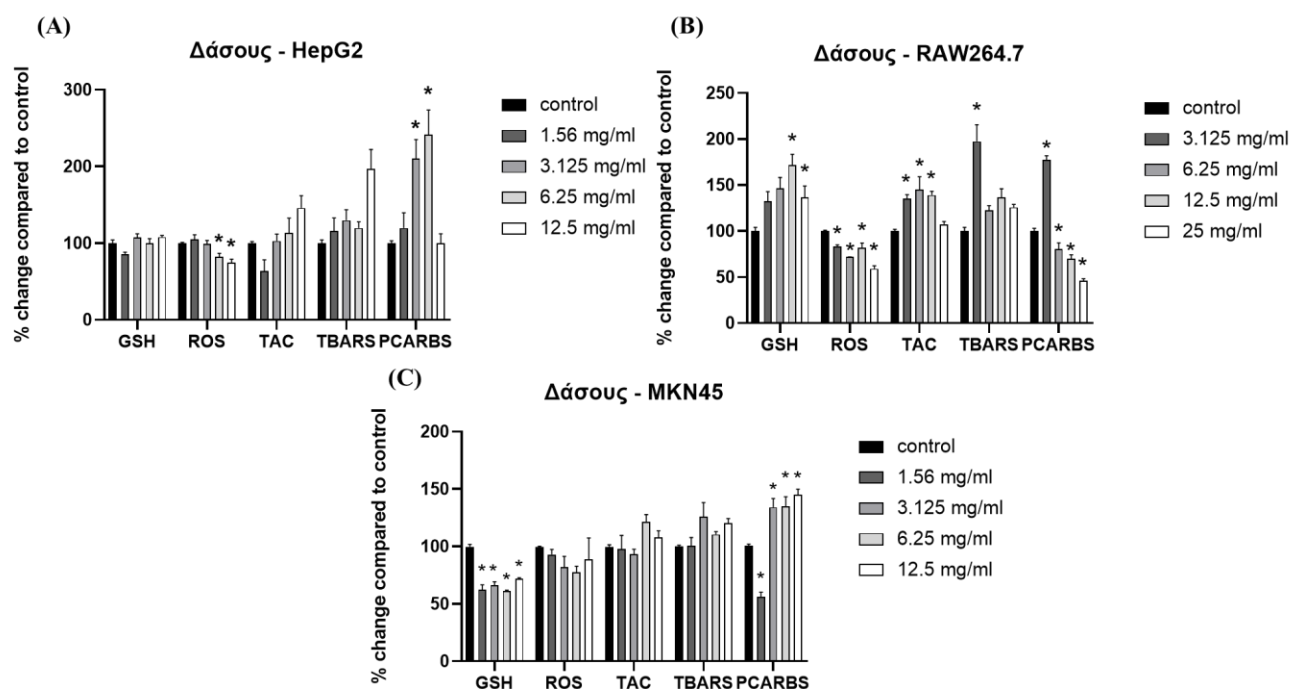


Διάγραμμα 23. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Γαλάζιο αγκάθι σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (A) κυτταρική σειρά HepG2, (B) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

Στο Διάγραμμα 24 απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μέλι Δάσους. Κάθε διάγραμμα αφορά μία από τις 3 κυτταρικές σειρές και 4 υποτοξικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα αναφορικά με τα ενδογενή επίπεδα ROS συμφωνούν ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές HepG2 και RAW264.7 αφού παρατηρείται μείωση. Αντιθέτως, τα επίπεδα της GSH ενώ αυξάνονται στα RAW264.7, στα MKN45 παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση. Το ίδιο, αντίστροφο μοτίβο παρατηρείται ανάμεσα στις δύο αυτές σειρές και στα αποτελέσματα του δείκτη Pcarbs αφού στην χαμηλότερη συγκέντρωση υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση στην σειρά MKN45 και αύξηση στην RAW264.7 με τα επίπεδα των υπόλοιπων

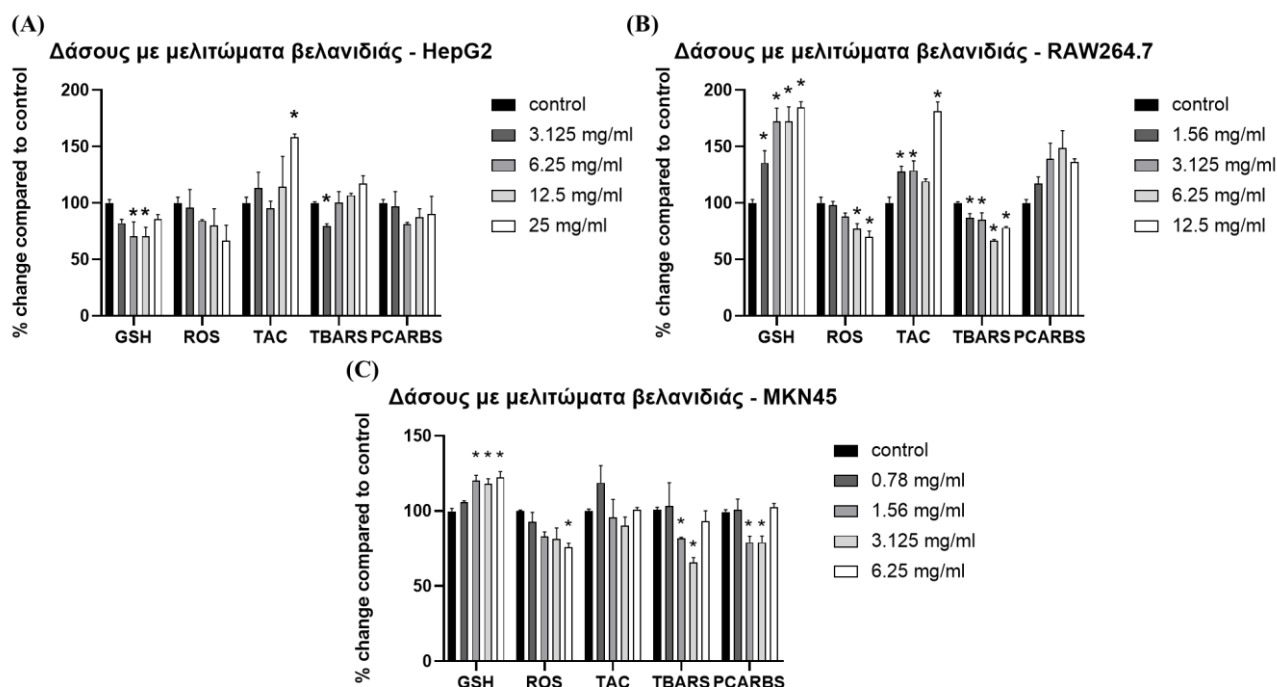
συγκεντρώσεων να αυξάνονται και να μειώνονται αντίστοιχα. Τέλος, υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC στην κυτταρική σειρά RAW264.7.



Διάγραμμα 24. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Δάσους σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (A) κυτταρική σειρά HepG2, (B) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

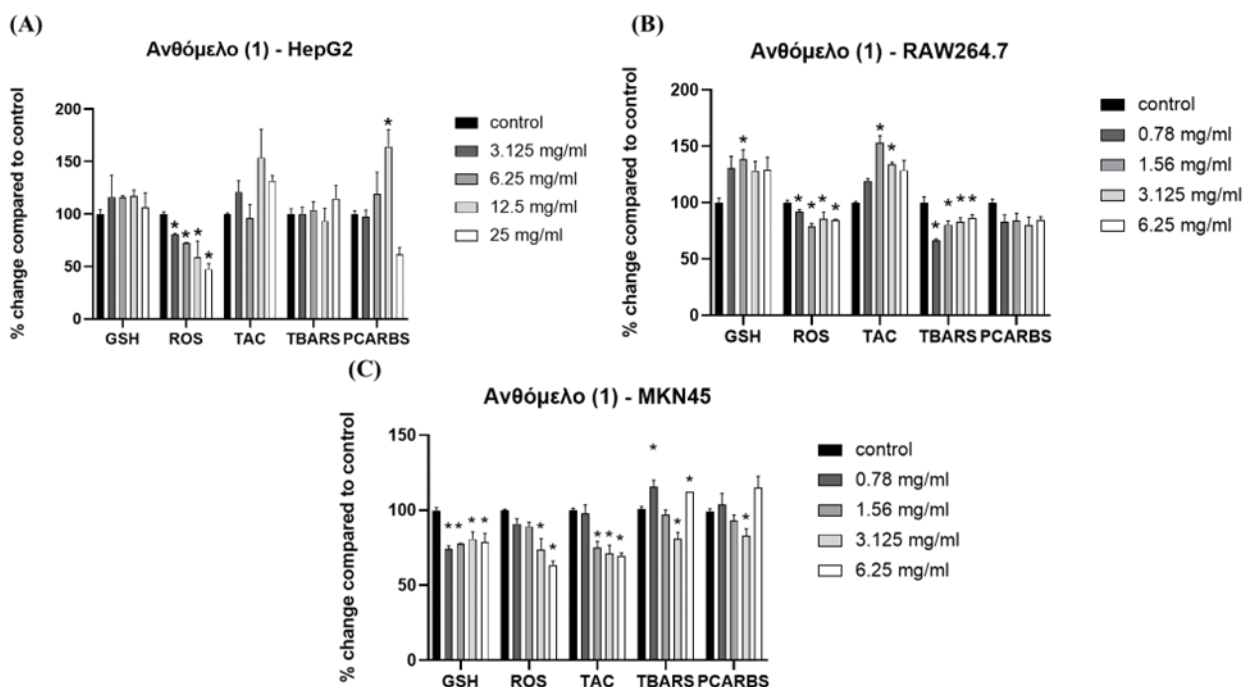
Στο **Διάγραμμα 25** απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μέλι Δάσους με μελιτώματα βελανιδιάς. Κάθε διάγραμμα αφορά μία από τις 3 κυτταρικές σειρές και 4 υποτοξικές συγκεντρώσεις. Το εξεταζόμενο μέλι επηρέασε σε όλες τις σειρές τα επίπεδα της GSH, ωστόσο με διαφορετικό τρόπο. Ειδικότερα, στις σειρές MKN45 και RAW264.7 υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ενώ στα HepG2 παρατηρήθηκε μείωση στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα του δείκτη tbars στις σειρές MKN45 και RAW264.7 παρουσίασαν επίσης ομοιομορφία αφού υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση. Στις 2 αυτές σειρές παρατηρήθηκε επίσης μείωση των ενδογενών επιπέδων ROS. Τέλος, το μέλι δάσους με μελιτώματα βελανιδιάς αύξησε τα επίπεδα της TAC στην κυτταρική σειρά RAW264.7.



Διάγραμμα 25. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Δάσους με μελιτώματα βελανιδιάς σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (A) κυτταρική σειρά HepG2, (B) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

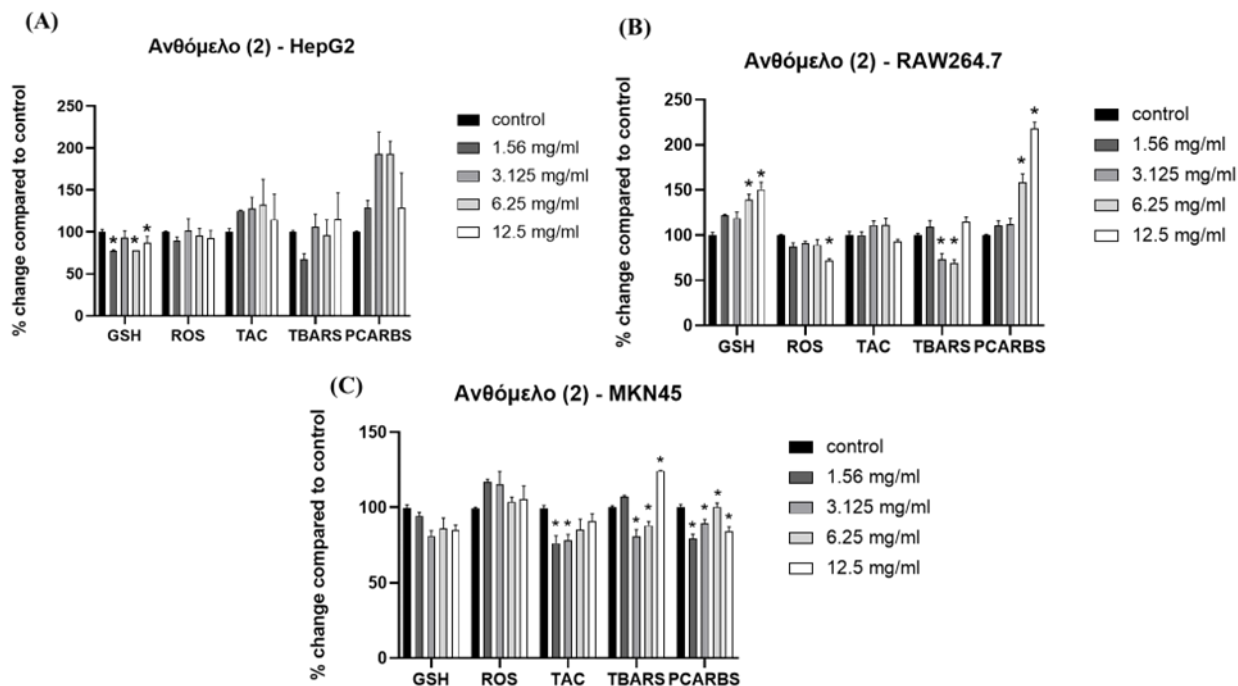
Στο Διάγραμμα 26 απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μέλι Δάσους με μελιτώματα βελανιδιάς. Κάθε διάγραμμα αφορά μία από τις 3 κυτταρικές σειρές και 4 υποτοξικές συγκεντρώσεις. Το Ανθόμελο (1) μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα των ROS σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ωστόσο στην κυτταρική σειρά MKN45 μείωσε και τα ενδογενή επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης. Στην ίδια κυτταρική σειρά μειώθηκαν και τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενώ τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης επηρεάστηκαν ανάλογα της συγκέντρωσης παρουσιάζοντας διφασικό φαινόμενο. Αντίστροφα, στην σειρά RAW264.7 τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά ενώ τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης μειώθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 26. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Ανθόμελο (1) σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (A) κυτταρική σειρά HepG2, (B) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

Στο [Διάγραμμα 27](#) απεικονίζονται τα αποτελέσματα αναφορικά με το μέλι Ανθόμελο (2). Κάθε διάγραμμα αφορά μία από τις 3 κυτταρικές σειρές και 4 υποτοξικές συγκεντρώσεις. Στην κυτταρική σειρά HepG2 υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH, ενώ αντίθετα τα επίπεδά της αυξήθηκαν έπειτα από την χορήγηση του μελιού στην κυτταρική σειρά RAW264.7. Αναφορικά με την κυτταρική σειρά MKN45 παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων και των 3 βιοδεικτών που αξιολογήθηκαν φασματοφωτομετρικά. Τέλος, η επίδραση του Ανθόμελου (2) ήταν διαφορετική αναφορικά με τον δείκτη πρωτεϊνική καρβονυλίωσης στην κυτταρική σειρά RAW264.7 αφού παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στις 2 υψηλότερες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 27. Αποτελέσματα της επίδρασης του δείγματος μελιού Ανθόμελο (2) σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε επίπεδο κυττάρων σειρών: (A) κυτταρική σειρά HepG2, (B) κυτταρική σειρά RAW264.7, και (C) κυτταρική σειρά MKN45.

*Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

4.3 Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού των αναλύσεων προέκυψε αρχικά ότι τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν στο σύνολο των κυτταρικών σειρών έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα των ROS συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον παρατηρήθηκε, κατά περίπτωση, διαφορετική απόκριση των κυτταρικών σειρών κατόπιν έκθεσής τους στο ίδιο δείγμα μελιού, ενώ τέτοιες διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων.

Το 2^ο επίπεδο αναλύσεων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αφορά την αξιολόγηση των μελιών που επιλέχθηκαν μετά το 1^ο επίπεδο αναλύσεων σε κυτταρικά συστήματα. Ειδικότερα αξιολογήθηκαν 4 πολυανθικά και 2 μονοανθικά μέλια, διαχωρισμός που έγκειται στην ποικιλομορφία του μελιού σαν τελικό προϊόν. Τα μέλια που αξιολογήθηκαν σε αυτό το επίπεδο αναλύσεων είναι τα: Βελανιδιάς, Γαλάζιο Αγκάθι (1), Δάσους, Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς, Ανθόμελο (1) και Ανθόμελο (2). Το μέλι χαρακτηρίζεται από τα πολύ υψηλά ποσοστά σακχάρων, ωστόσο στην σύστασή του διαθέτει ενώσεις με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα όπως είναι η χρυσίνη, και η κερκετίνη^{212,315}. Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθογένεια διαφορετικών καταστάσεων, επομένως είναι σημαντική η αξιολόγηση προϊόντων πλούσιων σε φυτοχημικές ενώσεις οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Προϊόντα με την ικανότητα να ενισχύουν τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ή/και να απομακρύνουν άμεσα οξειδωμένα προϊόντα του κυτταρικού κύκλου μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα για την ανθρώπινη υγεία, παρά το γεγονός ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους παραμένουν άγνωστοι.

Σε αυτή την κατεύθυνση, στην παρούσα Διατριβή έγινε μια προσπάθεια διερεύνησης των βιολογικών δράσεων δειγμάτων μελιού της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) στις κυτταρικές σειρές HepG2, MKN45 και RAW264.7. Οι καλά εδραιωμένες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται ευρέως για *in vitro* αναλύσεις. Ο λόγος για αυτό είναι η απεριόριστη πηγή κυττάρων με παρόμοιο γονότυπο και φαινότυπο μέσω διαδοχικών ανακαλλιιεργειών. Η ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά HepG2, χαρακτηρίζεται από μεγάλη διάρκεια ζωής, σταθερό φαινότυπο, υψηλή διαθεσιμότητα και εύκολο χειρισμό^{308,316}. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες που σχετίζονται με τον

μεταβολισμό και την καρκινογένεση στο ήπαρ, καθώς και σε διατροφικές μελέτες αφού βιομετασχηματίζονται στο ήπαρ μετά την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής στο έντερο ³⁰⁷. Τα κύτταρα MKN45 είναι επίσης ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά. Παρά το γεγονός ότι αποτελούν κυρίως μοντέλο για την μελέτη της βιολογίας του γαστρικού καρκίνου και της ανοσολογικής οδού που σχετίζεται με αυτόν, στην προκειμένη περίπτωση έγινε χρήση τους καθώς το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί κομμάτι της διαδρομής του μελιού. Όπως και τα HepG2, είναι εύκολη όσον αφορά την ανακαλλιέργεια της, ανθεκτική και καλά διατηρημένη μορφολογικά και λειτουργικά ³¹⁷. Τέλος, η κυτταρική σειρά RAW264.7 προέρχεται από όγκο σε αρσενικό ποντίκι που προκλήθηκε με τον ιό της λευχαιμίας του ποντικού Abelson, και είναι σειρά μακροφάγων κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια, βιοδραστικές ενώσεις που εντοπίζονται σε τρόφιμα και χρησιμοποιούνται για την άμβλυνση της φλεγμονής και την πρόληψη της εμφάνισης της, έχουν προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας με μελέτες να αναδεικνύουν την σχέση των πολυφαινολών με την μείωση της φλεγμονής ³¹⁸.

Σε μελέτες που έχουν προηγηθεί εξετάζεται κατά κύριο λόγο η εμπλοκή του μελιού σε μηχανισμούς όπως η απόπτωση που οδηγούν σε προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων ή σε αναστολή της βιωσιμότητας τους ^{195,285,319–321}. Αντιθέτως, στην παρούσα Διατριβή διερευνήθηκε η επίδραση των μελιών στις καρκινικές σειρές σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παραθέτονται στο προηγούμενο υποκεφάλαιο τα κύτταρα της σειράς RAW264.7 είναι αυτά που επηρεάστηκαν περισσότερο. Ειδικότερα, τα επίπεδα των ROS μειώθηκαν έπειτα από 24ωρη έκθεση των κυττάρων στα μέλια Βελανιδιάς, Δάσους και Ανθόμελο (1) ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, αποτέλεσμα που συνοδεύτηκε από αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων GSH στο μέλι Δάσους και Ανθόμελο (2) κατόπιν έκθεσης στις 2 υψηλότερες χορηγούμενες συγκεντρώσεις και στο μέλι Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Τα επίπεδα του δείκτη TAC αυξήθηκαν σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα μελιού, με εξαίρεση το Ανθόμελο (2) όπου δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Από τις μετρήσεις του δείκτη οξειδωσης των πρωτεϊνών (PCARBS), που προκαλεί μη αναστρέψιμες βλάβες στα κύτταρα προέκυψαν κάποια μεμονωμένα αποτελέσματα στο μέλι Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς τα οποία είναι δοσοεξαρτώμενα. Τέλος, τα αποτελέσματα αναφορικά με την λιπιδική υπεροξειδωση φαίνεται να σχετίζονται άμεσα το είδος του μελιού. Πιο

συγκεκριμένα τα επίπεδα των TBARS κατόπιν έκθεσης στο μέλι Βελανιδιάς αυξάνονται, ωστόσο συνοδεύονται από αύξηση της TAC και μείωση των ROS γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι επάγεται ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός ωστόσο δεν αρκεί για να προστατεύσει τα κύτταρα από βλάβες. Αντίθετα, στα μέλια Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς και Ανθόμελο (1) φαίνεται η ενεργοποίηση του μηχανισμού να επαρκεί για να προστατεύσει τα κύτταρα αφού υπάρχει αύξηση των δεικτών GSH και TAC, και μείωση των ROS και TBARS. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια ροή πληροφοριών στην βιβλιογραφία σχετικά με το μέλι Μανούκα, το οποίο είναι πλούσιο σε ενώσεις που σχετίζονται μεταξύ άλλων και με την αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική του δράση ³²². Από μελέτη που διερεύνησε την επίδραση του μελιού Μανούκα σε μακροφάγα κύτταρα (RAW264.7) προέκυψε ότι η αντιοξειδωτική του δράση σχετίζονταν με την μείωση της παραγωγής ROS, καθώς και με την προστασία από τις βλάβες των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Ο μηχανισμός αυτός συνοδεύτηκε από ενισχυμένη έκφραση του Nrf2 και αύξηση της έκφρασης των ενζύμων SOD, CAT και HO-1 ³¹⁸.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αναφορικά με τα κύτταρα HepG2 προέκυψε ότι στο Ανθόμελο (1) μειώθηκαν τα επίπεδα των ROS ενώ στα μέλια Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς και Ανθόμελο (2) μειώθηκαν τα επίπεδα της GSH σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός επάγεται κατά περίπτωση. Τα αυξημένα επίπεδα των ROS, συγκριτικά με τα φυσιολογικά, στα καρκινικά κύτταρα λόγω διαταραχών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση είναι τεκμηριωμένο βιβλιογραφικά, χαρακτηριστικό που τους δίνει τη δυνατότητα για ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, και επιβίωση ^{323,324}. Σε αυτή την περίπτωση τα μειωμένα επίπεδα των ROS πιθανόν οδηγούν σε γενετική αστάθεια και κυτταρικό θάνατο.

Η GSH είναι το πιο άφθονο ενδογενές αντιοξειδωτικό, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο στην αποτοξικοποίηση και σε μεταβολικές διεργασίες αφού έχει την ικανότητα να δωρίζει ένα άτομο υδρογόνου από τη σουλφυδρυλική της ομάδα, απομακρύνοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες και άλλα ηλεκτρόφιλα που χρησιμοποιούνται είτε άμεσα είτε έμμεσα ως υπόστρωμα από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα ³²⁵⁻³²⁷. Στην περίπτωση των HepG2, τα δείγματα μελιού δεν αύξησαν την παραγωγή GSH γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε σχετικά υψηλή έκφραση ορισμένων ενζύμων GST (π.χ. GSTa4, GSTM2, ή GSTT1) που έχουν προσδιοριστεί στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, το οποίο

μπορεί να έχει εφαρμογή και στα ευρήματα της παρούσης Διατριβής ³¹⁶. Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν η εμφάνιση ενός πιθανώς ορμετικού φαινομένου στο μέλι Βελανιδιάς. Πιο συγκεκριμένα, τα αυξημένα επίπεδα των υποπροϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα οποία παρατηρήθηκαν στην χαμηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, ακολουθήθηκαν από την επιστροφή τους σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η χορήγηση της υψηλότερης συγκέντρωσης προήγαγε και πάλι την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα της TAC. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι τα μέτρια επίπεδα δραστικών μορφών προκαλούν προσαρμογές των κυττάρων σε συνθήκες στρες, ένα φαινόμενο γνωστό ως όρμηση. Η όρμηση είναι ένα βιολογικό φαινόμενο που περιγράφει την ικανότητα των ζωντανών συστημάτων, από ένα μεμονωμένο κύτταρο έως οργανισμό, να προσαρμόζονται μετά από έκθεση σε χαμηλές δόσεις ενός στρεσογόνου παράγοντα ^{74,328}. Η εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση απόκριση μπορεί να εξηγήσει τόσο μηχανιστικές όσο και βιολογικές διαδικασίες, όπως η πρόκληση τοξικότητας, η επιδιόρθωση και η αποκατάσταση, δίνοντας στα βιολογικά συστήματα ένα εξελικτικό προσαρμοστικό σύστημα ³²⁹. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που εξηγούν την εμφάνιση της διφασικής δόσης σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων, όπως τα βότανα, ο καφές και διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις ^{28,74,330}.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των γαστρικών κυττάρων MKN45 δεν προέκυψε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο που να αφορά την απόκριση σε κάποιον δείκτη ή κάποιο πιθανό τρόπο δράσης συνολικά αφού η κυτταρική σειρά είχε διαφορετική απόκριση αναλογική του είδους μελιού μετά την έκθεση του σε αυτό. Εξάιρεση σε αυτή την παρατήρηση αποτελεί ο δείκτης PCARBS που φαίνεται να παρουσίασε την μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τους υπόλοιπους. Ειδικότερα στο μέλι Βελανιδιάς επηρεάστηκε μόνο ο δείκτης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με απόκριση αναλογική της συγκέντρωσης, αφού υπήρξε γενική μείωση των επιπέδων και αύξηση στη χαμηλότερη συγκέντρωση. Το ακριβώς αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε στο μέλι Δάσους, το οποίο όμως συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων της GSH σε όλες τις συγκεντρώσεις, μεταβολές που υποδεικνύουν ότι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά των κυττάρων μπορούν να αποτρέψουν την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Η έκθεση των κυττάρων στο μέλι Γαλάζιο Αγκάθι είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Το Ανθόμελο (1) μείωσε τα επίπεδα των ROS σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Η έκθεση των κυττάρων

στο μέλι Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού αφού η αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης συνοδεύτηκε από στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS και PCARBS. Τέλος, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του μελιού Ανθόμελο (2) προέκυψε μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, ωστόσο φαίνεται ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός λειτούργησε αφού υπάρχει και μείωση των επιπέδων TBARS και PCARBS. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται συσσωματώματα πρωτεϊνών (καρβονύλια) που δεν έχουν δυνατότητα αποικοδόμησης από τα πρωτεασώματα θέτοντας σε κίνδυνο τις λειτουργίες του κυττάρου καθώς και την βιωσιμότητά του ³³¹. Τα αποτελέσματα μελέτης που αξιολόγησε την επίδραση μελιού φράουλας σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, έδειξαν δόσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ³³². Μεταξύ άλλων γαστρικών κυττάρων υπάρχουν στοιχεία ότι στα MKN45 παρατηρείται αυξημένη GPX γεγονός που συχνά οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων ROS και της λιπιδικής υπεροξειδωσης με μείωση των επιπέδων της GSH. Η GPX είναι ένα ένζυμο που μεν καταλύει το H_2O_2 , χρησιμοποιεί όμως την GSH ως υπόστρωμα οξειδώνοντάς τη. Οι διαφοροποιήσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται φερρόπτωση, ένα σιδηροεξαρτώμενο, μη-αποπτωτικό τρόπο κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ROS. Κατά την φερρόπτωση έχουμε συρρίκνωση των μιτοχονδρίων, αύξηση της πυκνότητας της μεμβράνης τους άρα μείωση της διαπερατότητας ^{333–335}.

Είναι γνωστό ότι το μέλι διαθέτει ιδιότητες μεταξύ των οποίων και οι αντιοξειδωτικές, που οφείλονται στην περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Πολυφαινόλες, όπως η απιγενίνη, η κερκετίνη και η καεμφερόλη, μπορεί να ασκούν τις ιδιότητές τους μέσω της διαμόρφωσης ενζύμων, όπως ο NF-κB, ή ο Nrf2 ^{336–338}. Αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να συμβάλλουν συνεργιστικά στις αντιμεταβολικές επιδράσεις του μελιού ³³⁹.

Το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, είναι ένας συνήθης αντιοξειδωτικός μηχανισμός που επάγεται παρουσία χαμηλών επιπέδων οξειδωτικού στρες. Έχει βρεθεί ότι το μέλι μπορεί να ενεργοποιήσει τον βασικό ρυθμιστή της αντιοξειδωτικής άμυνας, τον Nrf2, τοποθετώντας τον στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση του Nrf2, με τη σειρά της, διευκολύνει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων-στόχων του

Nrf2 που ελέγχουν την αντιοξειδωτική άμυνα και την αυτοφαγία. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιούνται ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η SOD, η CAT και η GPX³⁴⁰. Μελέτη των Alvarez-Suarez et. al, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι μέλι του είδους Μανούκα είναι ικανό να προλαμβάνει την οξειδωτική βλάβη και διατηρεί τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού AMPK/Nrf2, με επακόλουθη αύξηση της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η SOD και η CAT³⁴¹.

Επιπλέον, το μέλι είναι επίσης γνωστό ότι μειώνει τα επίπεδα της μηλονδιαλδεΐδης (MDA), η οποία είναι ένα προϊόν της υπεροξειδωσης των λιπιδίων με υψηλή αντιδραστικότητα και τοξικότητα, καθιστώντας το έναν από τους πιο αξιόπιστους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες³⁴². Στην παρούσα Διατριβή τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τον δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι διφορούμενα καθώς μεταβάλλονται κατά περίπτωση. Μια μελέτη διαπίστωσε ότι η συμπληρωματική χορήγηση μελιού Tualang 1 g/kg για 12 εβδομάδες σε υπερτασικούς αρουραίους μείωσε τα επίπεδα μηλονδιαλδεΐδης (MDA) και μείωσε τη δραστηριότητα της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης (GST) και της CAT, ενώ αύξησε την έκφραση του Nrf2 σε επίπεδο mRNA³⁴³.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα του 2^{ου} επιπέδου αναλύσεων των δειγμάτων μελιού προέκυψε ότι έχουν άμεση επίδραση στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε διαφορετική απόκριση αναλογική τόσο του δείγματος, όσο και της κυτταρικής σειράς. Φαίνεται ότι το μέλι είναι ικανό να επάγει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των εξεταζόμενων κυτταρικών σειρών, χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρος από αυτό το επίπεδο αναλύσεων ο τρόπος με το οποίο μπορεί να επιδρούν στο κύτταρο.

5. Μελέτη επίδρασης της γέλης μελιού σε δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε υγιείς ανθρώπους

Τα διατροφικά αντιοξειδωτικά κατέχουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου ή ακόμη και στην απομάκρυνση τους αφού είναι μόρια υπεύθυνα για την πρόκληση πολυάριθμων παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών ³³⁶. Στόχος της συγκεκριμένης ενότητας της διδακτορικής διατριβής ήταν να εκτιμηθεί η *in vitro* αντιοξειδωτική δράση μιας γέλης με βάση το μέλι, που διατίθεται στο εμπόριο, καθώς και η πιθανή της επίδραση στις φυσιολογικές και οξειδοαναγωγικές προσαρμογές που επιτυγχάνονται μετά την κατανάλωσή της σε υγιείς ενήλικες συμμετέχοντες.

5.1 Υλικά και μέθοδοι

Στην κλινική μελέτη συμμετείχαν 20 υγιή άτομα που χωρίστηκαν σε 2 ίσες υποομάδες των 10 ατόμων αφού η προκαταρκτική ανάλυση (πιθανότητα σφάλματος 0,05 και στατιστική ισχύς 80%, πρόγραμμα G*Power) έδειξε ότι το μέγεθος αυτό του δείγματος ανά ομάδα ήταν το κατάλληλο ώστε να εντοπισθούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων. Ο διαχωρισμός στις ομάδες έγινε με βάση το φύλο, επομένως συμμετείχαν 10 άνδρες και 10 γυναίκες με διάμεση ηλικία $39,0 \pm 11,5$ έτη, και εύρος 22-52 έτη. Τα κριτήρια αποκλεισμού για την συμμετοχή στην κλινική μελέτη περιελάμβαναν:

1. απουσία μυοσκελετικού τραυματισμού και καρδιαγγειακής/μεταβολικής νόσου
2. την κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμακευτικής αγωγής τους 6 μήνες που προηγήθηκαν της 1ης αιμοληψίας, καθώς και κατά την διάρκεια των 14 ημερών μέχρι την 2η αιμοληψία
3. το κάπνισμα

Οι εθελοντές αφού ενημερώθηκαν για το σκοπό, τη μεθοδολογία και τους πιθανούς κινδύνους που συνδέονται με τη μελέτη παρείχαν τη γραπτή συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή, συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο και ένα ιστορικό υγείας.

Η γέλη που διατίθεται στην αγορά με την εμπορική ονομασία «Bear Strength honey gel» από την εταιρεία Nomad Premium Greek Honey είναι ένα 100% φυσικό και βιολογικό προϊόν με βασικό του συστατικό το μέλι ελάτου. Πιο συγκεκριμένα η γέλη αποτελείται κατά 87% από μέλι ελάτου, γύρη και αλάτι.

Οι συμμετέχοντες όφειλαν να καταγράψουν την διατροφική τους πρόσληψη τις τελευταίες 3 ημέρες πριν την 1η αιμοληψία, αφού έλαβαν οδηγία να επαναλάβουν το ίδιο διατροφικό πλάνο τις 3 τελευταίες ημέρες πριν την 2η αιμοληψία. Επιπλέον, πριν την κάθε αιμοληψία υποβλήθηκαν σε αξιολόγηση του φυσιολογικού τους προφίλ. Οι συμμετέχοντες λάμβαναν 70 g γέλης ημερησίως για 14 συνεχόμενες ημέρες. Εκτός από την κατανάλωση της γέλης, δεν υπήρχαν άλλοι περιορισμοί όσον αφορά την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, οι συμμετέχοντες όφειλαν να απέχουν από κάθε έντονη σωματική δραστηριότητα, πριν και μετά τη προγραμματισμένη δειγματοληψία αίματος και της αξιολόγησης του φυσιολογικού προφίλ ώστε να αποφευχθούν πιθανές μεταβολές του οξειδοαναγωγικού τους προφίλ που σχετίζονται με την άσκηση³⁴⁴. Τα πρώτα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από τους συμμετέχοντες πριν από την κατανάλωση της γέλης ορίστηκαν ως η ομάδα ελέγχου. Η φάση αυτή της κλινικής μελέτης όπως έχει περιγραφεί μέχρι στιγμής έλαβε χώρα στο Τμήμα Επιστήμης και Φυσικής Αγωγής (ΤΕΦΑΑ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα Τρίκαλα, με υπεύθυνο τον Καθηγητή της Βιοχημείας της Άσκησης Τζιαμούρτα Αθανάσιο. Η Επιτροπή Θεσμικού Ελέγχου του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (κωδικός πρωτοκόλλου: 1722/9-12-2020) ενέκρινε τις μεθόδους, τις διαδικασίες και τη δεοντολογία αυτής της μελέτης. Οι διαδικασίες συμφωνούσαν με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2013.

Στην συνέχεια τα δείγματα αίματος στάλθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών όπου έγινε αξιολόγηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των επιπέδων την ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT), των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) και της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (PCARBS). Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στη γέλη μελιού σχετικά με το συνολικό πολυφαινολικό της περιεχόμενο όπως αυτό περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.1.

5.1.1 Φυσιολογικές μετρήσεις

Ένα αναστημόμετρο (Beam Balance Stadiometer 208; Seca Ηνωμένο Βασίλειο) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της σωματικής μάζας και του ύψους (με ακρίβεια 0,05 kg και 0,1 cm) των συμμετεχόντων. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, οι συμμετέχοντες ήταν ξυπόλητοι και ελαφρά ντυμένοι ³⁴⁵. Περιφέρεια μέσης και ισχίων ελήφθησαν με μετροταινία ενώ ο λόγος μέσης προς ισχίο (WHR) υπολογίστηκε με τη χρήση της εξίσωσης: $WHR = \frac{\text{μέση περιφέρεια μέσης}}{\text{περιφέρεια ισχίων}}$. Το ποσοστό σωματικού λίπους μετρήθηκε με απορροφησιομετρία ακτίνων Χ διπλής ενέργειας (Lunar DPX, NT, GE Healthcare) ³⁴⁶. Ο καρδιακός ρυθμός σε κατάσταση ηρεμίας (RHR) μετρήθηκε με τη χρήση συσκευής παρακολούθησης καρδιακού ρυθμού (Polar Electro) με τους συμμετέχοντες σε ύπτια θέση και μετά από ανάπαυση 5 λεπτών ³⁴⁷. Η συστολική και διαστολική πίεση εκτιμήθηκαν από γιατρό με τη χρήση σφυγμομετρικού βραχίονα. νόμετρο (Precisa N R-1362, Rudolf Riester GmbH) σύμφωνα με τυποποιημένη διαδικασία που έχει καθιερωθεί από την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία ³⁴⁸. Εν συντομία, οι συμμετέχοντες έπρεπε να καθίσουν και να ξεκουραστούν για 5 λεπτά πριν από την εξέταση. Η συστολική και διαστολική πίεση μετρήθηκε σύμφωνα με την πρώτη και την πέμπτη κλίμακα Korotkoff και η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν (με ένα διάλειμμα 1 λεπτού μεταξύ των μετρήσεων) ³⁴⁹. Οι συμμετέχοντες ερωτήθηκαν για το αν αντιμετώπισαν κάποια δυσκολία στην προσπάθειά τους να καταναλώσουν το προϊόν ή αν υπήρξε οποιαδήποτε παρενέργεια μετά την κατανάλωση της γέλης μελιού. Η γενική εξέταση αίματος έγινε με αναλυτή.

5.1.2 Γενική εξέταση και διαχωρισμός Αίματος

Σε σωληνάρια EDTA συλλέχθηκαν 10ml αίματος, και ένα μικρό μέρος αναλύθηκε για την γενική αίματος (CBC) με τη χρήση αυτόματου αιματολογικού αναλυτή (Mythic 18 Orphee- Orphee-Medical- Cormay Diagnostics). Το υπόλοιπο αίμα φυγοκεντρήθηκε στα 1370 g για 10 λεπτά στους 4°C όπου απομονώθηκε και συλλέχθηκε το ανώτερο στρώμα (πλάσμα). Έπειτα έγινε αραιώση των ερυθροκυττάρων αραιώθηκε με νερό (1% v/v), και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 4000 g για 15 λεπτά στους 4°C και το συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Τόσο το λύμα των

ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCL) όσο και τα δείγματα πλάσματος αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση³⁵⁰.

5.1.3 Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin – Hb) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Ένα εμπορικό κιτ αιμοσφαιρίνης (no. 60230- Dutch Diagnostics BV) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 5 μl RBCL ήταν αναμειγνύονται με 1 ml αντιδραστηρίου αιμοσφαιρίνης (αντιδραστήριο R1, pH 7,3) ακολουθούμενα από ανάδευση και επώαση 10 λεπτών στο σκοτάδι. Μετά από επώαση μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 540 nm (Hitachi, UV-1900). Ως τυφλό, χρησιμοποιήθηκε 1 ml του αντιδραστηρίου (R1).

Υπολογισμοί

$$\text{Hb (g/dl)} = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) \times 29.4$$

- 29.4 = συντελεστής αραίωσης

5.1.4 Προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της GSH βασίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του μορίου με το διθειοδυο-νιτρο-βενζοϊκό-οξύ (DTNB) και το σχηματισμό GSSG και ενός έγχρωμου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 412nm^{254,351,352}.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του δείγματος μέσω μιας σειράς φυγοκεντρήσεων. 400 μl RBCL αναμείχθηκαν με 400 μl TCA (5%w/v), ακολουθούμενο από φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C . Έπειτα συλλέχθηκαν 300 μl στα οποία προστέθηκαν 90 μl TCA (5%w/v) και έγινε επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της μεθόδου. Ειδικότερα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 1,5 ml προστέθηκαν τα διαλύματα με την σειρά και στους όγκους που αναγράφονται στον Πίνακα 15 Ακολούθησε επώαση 15 λεπτών στο σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 412nm.

Πίνακας 15. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ανηγμένης Γλουταθειόνης.

	Τυφλό	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μl	660 μl
dH ₂ O	-	20 μl
Αιμόλυμα	20 μl	-
DTNB 1mM σε 1% Trisodium Citrate σε dH ₂ O	330 μl	330 μl
Ντελικό	1010 μl	

Υπολογισμοί

$$\text{GSH} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Hb}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 262,6 \right] \times 1000}{\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right)}$$

- 262.6 = συντελεστής αραίωσης
- 1000 = μετατροπή mmol/l σε μmol/l
- 13.6 = συντελεστής μοριακής απόσβεσης DTNB

5.1.5 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Μέσω της TAC αξιολογείται συνολικά η ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να ανάγουν της τεχνητής ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) στην αντίστοιχη υδραζίνη με την προσθήκη ατόμων υδρογόνου^{254,313}.

Πειραματική διαδικασία

Τα διαλύματα προστίθενται σε σειρά και όγκους σύμφωνα με τον πίνακα. Έπειτα ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση στα 15000 g σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Η οπτική απορρόφηση γίνεται στα 520 nm.

Πίνακας 16. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC στο πλάσμα.

	Τυφλό	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μ l	480 μ l
DPPH 0.1 mM	500	500 μ l
Πλάσμα	-	20 μ l
Υπελτικό	1000 μ l	

Υπολογισμοί

$$\frac{\text{mmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100} \right) \times 50 \times 50}{1000}$$

- 100 = μετατροπή ποσοστιαίας μείωσης απορρόφησης σε απλή μείωση
- 50 = η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μ mol/l
- 50 = η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα (1000 μ l/20 μ l)
- 1000 = μετατροπή l σε ml

5.1.6 Μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT)

Η καταλάση ανήκει στα αντιοξειδωτικά ένζυμα αφού έχει την ικανότητα να μετατρέπει ενώσεις με μεγάλη τοξικότητα σε λιγότερο επιβλαβή μόρια. Η κυριότερη ένωση που αποικοδομεί η καταλάση είναι το H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο^{254,352,353}.

Πειραματική διαδικασία

Σε 2991 μ l Phosphate buffer 67 mM, pH 7,4 προστίθεται 4 μ l αιμόλυμα αραιωμένο 1:10. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C. Έπειτα όλο το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία στην οποία

προστίθενται 5 μl H₂O₂ 30%. Ακολουθεί φωτομέτρηση 125 δευτερολέπτων στα 240 nm όπου διατηρείται η τιμή στα 120 δευτερόλεπτα και στο 0.

Υπολογισμοί

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{U}{mg \text{ Hb}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{\text{δείγματος}}}{min} \right)}{40} \times \frac{750 \times 10 \times 2 \times 1000}{Hb \left(\frac{mg}{mL} \right)}$$

- 40 = συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂(mol/l)
- 1000 = μετατροπή σε μmol/ml
- 750 = παράγοντας αραίωσης (από το δείγμα στον τελικό όγκο της αντίδρασης που είναι 3 ml)
- 10 = από την αρχική αραίωση του δείγματος 1:10 v/v
- 2 = προκύπτει από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων (βλ. 0)

5.1.7 Προσδιορισμός των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)

Η αρχή της μεθόδου και η διαδικασία περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.1.6 , ωστόσο υπάρχουν κάποιες διαφορές στα διαλύματα, καθώς και στους υπολογισμούς. Αναλυτικότερα, αντί για PBS και κυτταρόλυμα σε συνολικό όγκο 400 μl προστέθηκαν 100 μl πλάσμα στο δείγμα και 100 μl dH₂O στο τυφλό με τελικό όγκο αντίδρασης 3100 μl^{254,314}.

Υπολογισμοί

$$TBARS \left(\frac{\mu mol}{l \text{ πλάσματος}} \right) = \left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31$$

- 31 = συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην αντίδραση
- 0.156 = συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA /10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/l σε μmol/l

5.1.8 Προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS)

Η αρχή της μεθόδου και η διαδικασία περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.1.7. Η διαφορά στην διαδικασία έχει να κάνει με τον χειρισμό του βιολογικού υλικού. Σε 50 μl πλάσματος προστίθενται 50 μl TCA 20% (w/v) και ακολουθεί ανάδευση επώαση για 15 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και ακολουθείτε η διαδικασία όπως περιγράφεται στο 4.1.7 με την προσθήκη DNPH στα δείγματα και HCL στα τυφλά κ.ο.κ..

Υπολογισμοί

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \times 20$$

- 0,022 = συντελεστής μοριακής απόσβεσης DNPH
- 20 = συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην κυψελίδα

5.1.9 In vitro αξιολόγηση της γέλης μελιού

Για την in vitro αξιολόγηση της γέλης μελιού ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1. Ειδικότερα αξιολογήθηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο μέσω της μεθόδου Folin-ciocalteau, η ικανότητα της να αναστέλλει την δράση 2 εμπορικά διαθέσιμων ελευθέρων ριζών και 2 που σχηματίζονται φυσιολογικά στον οργανισμό και είναι γνωστές για την υψηλή τους δράση (ρίζα υδροξυλίου και ανιόν σουπεροξειδίου), την ικανότητα της να προστατεύει το DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου καθώς και την αναγωγική της ισχύ.

5.1.10 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των δεδομένων επαληθεύτηκε με τη χρήση του Shapiro-Wilk test. Οι μετρήσεις πριν και μετά την κατανάλωση της γέλης μελιού συγκρίθηκαν με τη χρήση paired t-tests. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GraphPad Prism έκδοση 8.0.1 (για Windows - GraphPad Software, Inc.) και εκφράστηκε ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM). Κάθε δοκιμασία εκτελέστηκε εις τριπλούν. Όταν το $p < 0,05$ θεωρήθηκε ως ένδειξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

5.2 Αποτελέσματα

Πίνακας 17. Αποτελέσματα αναφορικά με την *in vitro* αξιολόγηση της εμπορικά διαθέσιμης γέλης μελιού.

TPC	DPPH	ABTS	Hydroxyl radical	Superoxide radical	Peroxyl radical	Reducing power
mg GAE/g gel	IC50 (mg/ml) $\pm$ SD	IC50 (mg/ml) $\pm$ SD	IC50 (mg/ml) $\pm$ SD	IC50 (mg/ml) $\pm$ SD	IC50 (mg/ml) $\pm$ SD	AU0,5 (mg/ml) $\pm$ SD
1.425	3.74 $\pm$ 0.28	3.68 $\pm$ 0.33	4.01 $\pm$ 0.04	2.00 $\pm$ 0.01	5.15 $\pm$ 0.27	1.93 $\pm$ 0.02

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την *in vitro* αξιολόγηση της γέλης μελιού. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο της ήταν 1.425 mg GAE/ g γέλης. Όσον αφορά την δράση της ενάντια των ριζών, υπάρχει μια συνοχή ως προς τις τιμές IC50, ωστόσο φαίνεται να υπάρχει μια αυξημένη δραστηριότητα σχετικά με το ανιόν του σουπεροξειδίου. Επίσης παρουσίασε και υψηλή αναγωγική ικανότητα.

Όλα τα αποτελέσματα που αφορούν την κλινική μελέτη, θα παρουσιάζονται συγκριτικά ανάμεσα στις 2 μετρήσεις πριν την κατανάλωση της γέλης μελιού (PRE) και 14 ημέρες μετά την κατανάλωση αυτής (POST). Όπως αναφέρεται παραπάνω έγινε και περαιτέρω στατιστική ανάλυση βάσει φύλου. Οι συμμετέχοντες δεν ανέφεραν παρενέργειες από την κατανάλωση της γέλης με βάση το μέλι. Στον Πίνακα 18

απεικονίζονται τα αποτελέσματα της γενικής εξέτασης αίματος στα οποία δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα γενικής εξέτασης αίματος (CBC). WBC: White blood cells, LYM: Lymphocytes, MON: monocytes, GRA: granulocytes, RBC: red blood cells, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW: red blood cell distribution width, PLT: platelets, MPV: mean platelet volume, PCT: volume occupied by platelets in the blood as a percentage, PDW: Platelet Distribution Width. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).

Ομάδα Μέτρηση	ΣΥΝΟΛΟ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ		ΑΝΔΡΕΣ	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	5,61 $\pm$ 0,32	5,67 $\pm$ 0,34	5,49 $\pm$ 0,31	5,54 $\pm$ 0,34	5,74 $\pm$ 0,32	5,81 $\pm$ 0,32
LYM (%)	36,19 $\pm$ 1,65	35,96 $\pm$ 1,55	37,42 $\pm$ 1,79	36,7 $\pm$ 1,96	34,96 $\pm$ 1,29	35,23 $\pm$ 1,73
MON (%)	4,56 $\pm$ 0,49	4,05 $\pm$ 0,46	4,71 $\pm$ 0,58	3,38 $\pm$ 0,30	4,42 $\pm$ 0,34	4,73 $\pm$ 0,48
GRA (%)	59,24 $\pm$ 1,92	59,98 $\pm$ 1,69	57,87 $\pm$ 2,17	59,92 $\pm$ 1,22	60,62 $\pm$ 1,39	60,04 $\pm$ 1,98
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	4,66 $\pm$ 0,18	4,65 $\pm$ 0,18	4,38 $\pm$ 0,08	4,38 $\pm$ 0,09	4,94 $\pm$ 0,2	4,92 $\pm$ 0,19
HGB (g/dl)	14,17 $\pm$ 0,36	14,14 $\pm$ 0,36	13,54 $\pm$ 0,32	13,53 $\pm$ 0,36	14,81 $\pm$ 0,27	14,76 $\pm$ 0,22
HCT (%)	40,82 $\pm$ 0,89	40,44 $\pm$ 0,89	39,46 $\pm$ 0,86	39,03 $\pm$ 0,95	42,19 $\pm$ 0,63	41,85 $\pm$ 0,46
MCV (μm^3)	88,28 $\pm$ 2,39	87,64 $\pm$ 2,39	90,09 $\pm$ 1,34	89,14 $\pm$ 1,53	86,47 $\pm$ 2,89	86,14 $\pm$ 2,84
MCH (pg)	30,68 $\pm$ 0,97	30,65 $\pm$ 0,92	30,96 $\pm$ 0,69	30,91 $\pm$ 0,61	30,41 $\pm$ 1,14	30,40 $\pm$ 1,10
MCHC (g/dl)	34,71 $\pm$ 0,39	34,96 $\pm$ 0,27	34,33 $\pm$ 0,41	34,66 $\pm$ 0,17	35,09 $\pm$ 0,28	35,26 $\pm$ 0,30
RDW (%)	13,46 $\pm$ 0,44	13,60 $\pm$ 0,37	13,17 $\pm$ 0,29	13,35 $\pm$ 0,30	13,76 $\pm$ 0,52	13,85 $\pm$ 0,39
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	268,70 $\pm$ 17,00	272,08 $\pm$ 19,65	276,20 $\pm$ 14,11	263,30 $\pm$ 17,22	261,30 $\pm$ 18,4	282,30 $\pm$ 20,45
MPV (μm^3)	7,92 $\pm$ 0,21	8,12 $\pm$ 0,21	7,82 $\pm$ 0,14	8,19 $\pm$ 0,27	8,02 $\pm$ 0,25	8,05 $\pm$ 0,24
PCT (%)	0,21 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
PDW (%)	14,89 $\pm$ 0,47	15,39 $\pm$ 0,59	14,4 $\pm$ 0,36	15,36 $\pm$ 0,48	15,39 $\pm$ 0,49	15,43 $\pm$ 0,65

Παρά το γεγονός ότι στην γενική εξέταση αίματος δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή, η κατανάλωση γέλης μελιού είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της διαστολικής πίεσης καθώς και του λόγου συστολικής και

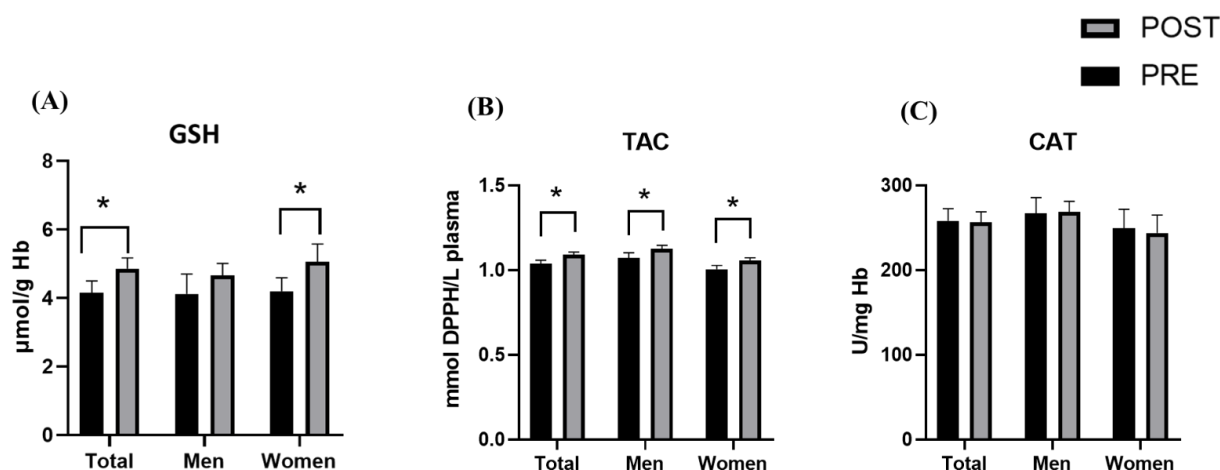
διαστολικής στον γενικό πληθυσμό και στην ομάδα των γυναικών όπως φαίνεται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα φυσιολογικών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).

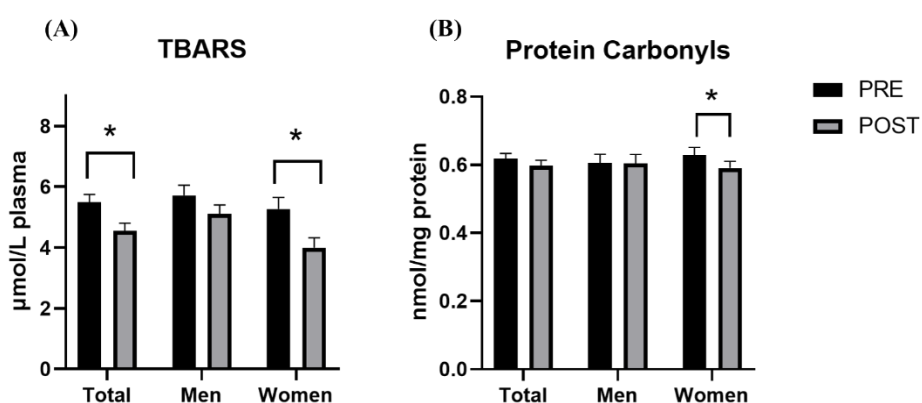
Ομάδα Μέτρηση	ΣΥΝΟΛΟ		ΓΥΝΑΙΚΕΣ		ΑΝΔΡΕΣ	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Βάρος (kg)	76,82 $\pm$ 4,02	77,1 $\pm$ 4,15	61,65 $\pm$ 2,15	61,5 $\pm$ 2,14	91,99 $\pm$ 3,46	92,7 $\pm$ 3,49
Ύψος (m)	1,73 $\pm$ 0,02	1,73 $\pm$ 0,02	1,66 $\pm$ 0,02	1,66 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,02
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	25,34 $\pm$ 0,98	25,42 $\pm$ 1,00	22,39 $\pm$ 0,88	22,33 $\pm$ 0,87	28,29 $\pm$ 1,07	28,51 $\pm$ 1,07
Λίπος (%)	27,28 $\pm$ 1,24	27,65 $\pm$ 1,22	28,95 $\pm$ 1,61	29,1 $\pm$ 1,69	25,61 $\pm$ 1,64	26,21 $\pm$ 1,55
Περίμετρος μέσης (cm)	84,82 $\pm$ 3,02	84,60 $\pm$ 3,14	73,50 $\pm$ 1,67	72,90 $\pm$ 1,79	96,15 $\pm$ 2,59	96,30 $\pm$ 2,64
Περίμετρος ισχίου (cm)	104,20 $\pm$ 1,72	104,30 $\pm$ 1,74	99,20 $\pm$ 1,50	99,20 $\pm$ 1,56	109,30 $\pm$ 1,99	109,50 $\pm$ 1,96
Λόγος μέτρησης περιφέρειας και ισχίου (ratio)	0,81 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01
Συστολική πίεση (mm Hg)	115,70 $\pm$ 2,25	111,20 $\pm$ 2,52	112,70 $\pm$ 4,03	105,00 $\pm$ 3,24	118,80 $\pm$ 1,11	117,40 $\pm$ 2,47
Διαστολική πίεση (mm Hg)	79,10 $\pm$ 2,05	74,75 $\pm$ 2,52*	75,70 $\pm$ 2,87	68,70 $\pm$ 2,92*	82,50 $\pm$ 2,34	80,80 $\pm$ 2,88
Καρδιακοί παλμοί σε ηρεμία (b/min)	63,85 $\pm$ 1,49	62,20 $\pm$ 1,7	64,70 $\pm$ 1,69	64,70 $\pm$ 1,92	63,00 $\pm$ 2,33	59,70 $\pm$ 2,48
Λόγος αρτηριακής πίεσης (mm Hg)	91,30 $\pm$ 2,12	86,88 $\pm$ 2,52*	88,02 $\pm$ 3	80,79 $\pm$ 2,91*	94,58 $\pm$ 2,83	92,99 $\pm$ 2,44

Αναφορικά με τα αποτελέσματα των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, η κατανάλωση της γέλης με βάση το μέλι οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της TAC τόσο στο σύνολο των συμμετεχόντων όσο και στις επιμέρους ομάδες. Τα επίπεδα της GSH αυξήθηκαν στο σύνολο των συμμετεχόντων, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται κυρίως στην ομάδα των γυναικών αφού η επιμέρους στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση μόνο σε αυτή την ομάδα. Τα αποτελέσματα της αποικοδόμησης του H_2O_2 από το ένζυμο της καταλάσης δεν κατέληξαν σε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 28.



Διάγραμμα 28. Επιδράσεις της γέλης μελιού στα επίπεδα της (Α) GSH, (Β) TAC, και της (C) CAT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

Στους δείκτες που σχετίζονται με βλάβες των βιομορίων προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες, η κατανάλωση γέλης μελιού είχε επίδραση στην ομάδα των γυναικών. Πιο συγκεκριμένα, βελτίωσε τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης. Επιπλέον, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης μετά την κατανάλωση της γέλης μελιού και στο σύνολο των συμμετεχόντων. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο [Διάγραμμα 29](#).



Διάγραμμα 29. Επίδρασεις της γέλης μελιού στα επίπεδα των (Α) TBARS, και (Β) Protein carbonyls (PCARBS). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM. *Στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

5.3 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που προσδιορίζει μεταβολικές αλλαγές μετά την κατανάλωση γέλης με βάση το μέλι σε υγιή άτομα μέσω αξιολόγησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης και φυσιολογικών παραμέτρων. Γενικότερα, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που να σχετίζονται με το μέλι ή/και προϊόντα αυτού. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν μια σημαντική βελτίωση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος των συμμετεχόντων, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση των επιπέδων TAC και GSH και τη μείωση των TBARS και PCARBS σε συνδυασμό με τη μείωση της διαστολικής πίεσης και του λόγου διαστολικής και συστολικής πίεσης των συμμετεχόντων, χωρίς να επηρεάζεται το αιματολογικό τους προφίλ. Το μέλι θεωρούνταν από την αρχαιότητα τροφή με υψηλή διατροφική σημασία, που χρησιμοποιήθηκε σε πολυάριθμες ιατρικές θεραπείες παγκοσμίως λόγω τις αντιφλεγμονώδους δράσης και των αντιβακτηριδιακών ιδιοτήτων του ²¹⁶. Επιπροσθέτως, στη βιβλιογραφία αναφέρονται οι χημειοπροστατευτικές, ανοσορρυθμιστικές, αντιοξειδωτικές και αντιαθηρογενετικές ιδιότητες του μελιού ³⁵⁴⁻³⁵⁷. Παρ' όλα αυτά, οι πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες του ελληνικού μελιού στη βιβλιογραφία και ειδικότερα σε *in vivo* μελέτες είναι ελάχιστες, παρόλο που η Ελλάδα αποτελεί μέρος της ανατολικής Μεσογείου, με πλούσια και διαφοροποιημένη χλωρίδα ^{257,358}.

Σύμφωνα με τα *in vitro* αποτελέσματά μας όσον αφορά την γέλη με βάση το μέλι, παρατηρήθηκε υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο (1,29 mg GAE/g μελιού), σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των δειγμάτων ακατέργαστου μελιού της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Σύμφωνα με μελέτη των Chau et al, αφού εξέτασαν διάφορους τύπους μελιού, όπως το μέλι του δάσους, παρουσίασαν τα αποτελέσματα τους αναφορικά με το πολυφαινολικό περιεχόμενο με τιμές που κυμαίνονται από 19,7 έως 85 mg GAE/100 g μέλι ³⁵⁹, σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με την εξεταζόμενη σε αυτό το κεφάλαιο γέλη μελιού (1,4 mg GAE/ g γέλης). Όσον αφορά μια μελέτη που αξιολόγησε 105 διαφορετικούς τύπους ακατέργαστου μελιού, παραγόμενα σε 3 χώρες, η γέλη με βάση το μέλι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρουσίασε υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο από όλα τα δείγματα μελιού, εκτός από το μέλι φαγόπυρου ³⁶⁰. Επιπλέον, παρουσίασε υψηλότερο

πολυφαινολικό περιεχόμενο και από όλα τα εξεταζόμενα μέλια της παρούσης Διατριβής.

Το υψηλό επίπεδο TPC, που προσδιορίστηκε στο προϊόν που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να οφείλεται σε ουσίες που βρίσκονται στο μέλι και είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση όπως το καφεϊκό οξύ, η κερκετίνη και η καμφερόλη ^{361,362} αφού αποτελείται κατά 87% από μέλι ελάτου, ωστόσο στο μίγμα περιέχονται και σημαντικά ποσοστά γύρης. Η γύρη, εκτός από λιπίδια, σάκχαρα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, υδατάνθρακες και αμινοξέα, περιέχει πολυφαινόλες όπως φλαβονοειδή ³⁶³ που σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες ³⁶⁴. Με βάση αυτό, υποθέτουμε ότι μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του πολυφαινολικού περιεχομένου της γέλης με βάση το μέλι οφείλεται και στην παρουσία γύρης.

Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην γενική εξέταση αίματος των συμμετεχόντων, ωστόσο στις φυσιολογικές μετρήσεις, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη διαστολική πίεση και τη μέση αρτηριακή πίεση. Είναι γνωστό ότι η υπέρταση αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για νεφρικά και καρδιαγγειακά νοσήματα ³⁶⁵. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται επίσης στην παθογένεια της υπέρτασης, αν και υπάρχουν στοιχεία στην βιβλιογραφία που υποδεικνύουν την πιθανότητα η υπέρταση να οδηγεί σε ανάπτυξη οξειδωτικού στρες ^{366,367}. Συνολικά, η ευεργετική επίδραση των αντιοξειδωτικών στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης και την μείωση της υψηλής αρτηριακής πίεσης, επιβεβαιώνουν τον αρνητικό ρόλο του οξειδωτικού στρες στη διαχείριση της υπέρτασης ³⁶⁸.

Προηγούμενη μελέτη διερεύνησε τις επιδράσεις του μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγής που αξιολογήθηκαν σε δείγματα νεφρών αρουραίων με σακχαρώδη διαβήτη και υπέρταση ³⁶⁹. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποκάλυψαν μια αύξηση των επιπέδων της ενδοκυττάριας GSH στο νεφρό και της ανηγμένης/οξειδωμένης GSH (GSH/GSSG) μετά τη χορήγηση συμπληρώματος μελιού για 3 εβδομάδες σε αρουραίους ³⁶⁹. Η παρούσα μελέτη έδειξε σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH μετά την κατανάλωση της γέλης με βάση το μέλι. Τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης υποστηρίζουν το ρόλο του μελιού στη ρύθμιση της των επιπέδων της GSH, καθώς οι διαβητικοί αρουραίοι που κατανάλωναν μέλι για 4 εβδομάδες παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH στους νεφρούς. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης ³⁷⁰. Τα

προαναφερθέντα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GSH και της TAC.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναφορικά με τα επίπεδα των δεικτών TBARS και PCARB συμφωνούν με άλλες μελέτες³⁷¹⁻³⁷³ όπου η κατανάλωση μελιού είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές μειώσεις των MDA επιπέδων, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου δείκτη οξειδωτικού στρες που χρησιμοποιεί αντιδραστήριο TBA, για την ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων³⁷². Επιπλέον, μειώθηκαν και τα επίπεδα των PCARB μετά από κατανάλωση συμπληρώματος μελιού Tualang 0,2 g/kg σωματικού βάρους/ημέρα για 18 ημέρες³⁷³. Ωστόσο η μελέτη αυτή αφορούσε αθλήτριες, συμπεριλαμβάνοντας έναν διαφορετικό παράγοντα συγκριτικά με την παρούσα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Διατριβής καταλήγουν αποτελέσματα επίσης πιλοτικής κλινικής μελέτης σε υγιή άτομα, που δημοσιεύθηκε από Έλληνες ερευνητές και αφορά μέλι που παράχθηκε στην περιοχή της Χαλκιδικής. Ειδικότερα, κατόπιν κατανάλωσης μελιού ανθέων καθημερινά για ένα μήνα, μειώθηκαν τα επίπεδα των ROS στο πλάσμα των συμμετεχόντων. Η στατιστικά σημαντική διαφορά αφορά τα αποτελέσματα 2 αιμοληψιών (πριν και μετά την κατανάλωση του μελιού) στα ίδια άτομα³⁷⁴. Παλαιότερη πιλοτική κλινική μελέτη υποστηρίζει ότι η κατανάλωση μελιού μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η GR³⁷⁵.

Ένας από τους στόχους της μελέτης ήταν να διερευνηθούν πιθανές διαφορές απόκρισης στους εξεταζόμενους δείκτες, κατόπιν της κατανάλωσης της γέλης μελιού, που να σχετίζονται με το φύλο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γυναίκες ανταποκρίθηκαν καλύτερα, καθώς υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές μειώσεις στη διαστολική πίεση, τη μέση αρτηριακή αρτηριακή πίεση καθώς και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την μεγαλύτερη παρουσία οιστρογόνων στον γυναικείο οργανισμό³⁷⁶. Πράγματι, τα επίπεδα των οιστρογόνων έχουν θετική συσχέτιση με τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του πλάσματος και των αντιοξειδωτικών ενζύμων που εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου³⁷⁷ και μπορούν να αποτρέψουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων³⁷⁸. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό των οιστρογόνων, μπορεί να έχει επίσης άμεση επίδραση στη δραστηριότητα των ελεύθερων ριζών αφού. Ειδικότερα η 17β-οιστραδιόλη (E2), έχει δομή που της επιτρέπει να δρα άμεσα έναντι των ελευθέρων ριζών αφού η E2

φαινολική της ομάδα είναι δότης υδρογόνου ³⁷⁹, μια υπόθεση που έχει επαληθευτεί μέσω μελετών *in vitro* και *ex vivo* σε ζώα ³⁸⁰. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι υποδοχείς των οιστρογόνων (ERα, ERβ) μπορούν και δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα (π.χ. SOD, Catalase και GPx) ^{381,382}. Παρά τις ενδείξεις, η άμεση συσχέτιση μεταξύ του αντιοξειδωτικού ενζυμικού συστήματος και των οιστρογόνων δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί στον άνθρωπο ³⁸³.

Παρά τον μικρό αριθμό συμμετεχόντων, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ενθαρρυντικά αφού δείχνουν ότι η κατανάλωση της γέλης μελιού έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στην αρτηριακή πίεση και στους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, οι οποίες ωστόσο είναι πιο εμφανείς στις γυναίκες. Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να αξιολογήσουν διαφορετικές δοσολογίες και διάρκεια του χρόνου χορήγησης του συμπληρώματος.

6. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Το μέλι είναι αναγνωρισμένο και χρησιμοποιείται τόσο για τις διατροφικές όσο και για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες για περισσότερα από 2000 χρόνια. Η κατηγοριοποίησή του έχει να κάνει με την διατροφή της μέλισσας, η οποία καθορίζει και την σύστασή του ^{384,385,386}. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή συστατικά του μελιού είναι κυρίως υπεύθυνα για τις βιολογικές του δράσεις. Ενώ υπάρχουν μελέτες στην βιβλιογραφία που προτείνουν ως βιοδείκτη, τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων ως τρόπο ταυτοποίησης των μονοανθικών μελιών ³⁸⁷. Το μέλι παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική, και αντικαρκινική ^{220,318,322,388,389}. Έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί ως πιθανοί για να εξηγήσουν τις ιδιότητες αυτές τους μελιού, ωστόσο το βιοδραστικό του προφίλ είναι δύσκολο να περιγραφεί δεδομένου ότι είναι ένας συνδυασμός περίπου 200 ενώσεων ^{281,390}.

Σκοπός της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης γηγενών ποικιλιών μελιού σε *in vitro* κυτταρικά και μη συστήματα, καθώς και η βιολογική δράση γέλης μελιού *in vivo*. Η μελέτη αφορά δείγματα μελιού που παράγονται στη χώρα μας, αφού η πλούσια βιοποικιλότητα σε συνδυασμό με την ηλιοφάνεια, δημιουργεί ένα ιδανικό περιβάλλον με αποτέλεσμα σε μια ποικιλία τύπων μελιού που προέρχονται κυρίως από πεύκο, θυμάρι, έλατο και άλλα κωνοφόρα. Η Διατριβή ξεκίνησε με ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον ορισμό του πειραματικού σχεδιασμού, καταλήγοντας στα δείγματα που εξετάστηκαν στη μελέτη. Ειδικότερα, στο 1^ο επίπεδο αναλύσεων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 16 διαφορετικά είδη μελιού οι οποίες αρχικά αφορούσαν το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, όπως και την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου. Εξετάστηκε επίσης η αναγωγική τους ικανότητα που εξ ορισμού συνδέεται με την αντιοξειδωτική. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με διαφορετικούς τρόπους καταλήγοντας σε ευρήματα όπως ότι η ομαδοποίηση και αξιολόγησή τους σε μονοανθικά και πολυανθικά κατέληξε σε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα μόνο για την μέθοδο ABTS, υπέρ των πολυανθικών. Επιπλέον, προέκυψε αρνητική συσχέτιση σε επιπλέον στατιστική ανάλυση που αφορούσε το συνολικό πολυφαινολικό

περιεχόμενο και τις μεθόδους αναστολής της δράσης του ABTS και του ανιόντος υπεροξειδίου, της προστασίας του DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου και της αναγωγικής ισχύος καταλήγοντας στο συμπέρασμα, ότι όσο υψηλότερο το πολυφαινολικό περιεχόμενο, τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική δράση. Ενδιαφέρον προκάλεσε το δείγμα μελιού Ελάτου αφού παρά το γεγονός ότι δεν είχε ιδιαίτερα υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο, ξεχώρισε λόγω της υψηλής δράσης του σε αρκετές μεθόδους. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων που συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, ή σε συνεργιστική δράση τους. Επιπλέον, η μέθοδος Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή είναι μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των πολυφαινολών μη προσδιορίζοντας την βιοδιαθεσιμότητα ή την ενεργότητά τους, ενώ μπορεί να υπάρχουν και άλλες ενώσεις που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα ^{277,278,391}. Οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, επειδή είναι δότες ατόμων υδρογόνου και ηλεκτρονίων με σκοπό να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, το καφεϊκό οξύ (CA) και το χλωρογενικό οξύ είναι πολυφαινόλες που διαθέτουν ιδιότητες χηλικοποίησης του σιδήρου και σταθεροποίησης του σιδήρου, οι οποίες αποτρέπουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών, καθιστώντας τες σπουδαία αντιοξειδωτικά ³⁹²⁻³⁹⁴. Το προφίλ των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών του μελιού ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες, όπως το κλίμα, οι γεωγραφικοί παράγοντες και η αφθονία των ανθέων ³⁹⁵.

Από διατροφικής άποψης, η βιοδιαθεσιμότητα είναι το κλάσμα ενός θρεπτικού συστατικού που υπάρχει σε ένα τρόφιμο το οποίο απορροφάται, διατηρείται και χρησιμοποιείται για φυσιολογικές λειτουργίες μέσω φυσιολογικών οδών. Είναι καλά διαπιστωμένο ότι οι προσλαμβανόμενες φαινολικές ενώσεις επιβιώνουν της πέψης στο ανώτερο πεπτικό σύστημα και φθάνουν σε σημαντικές δόσεις σε διάφορα μέρη του εγγύς και του άπω εντέρου. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης διαδικασίας, οι φαινόλες συζευγνύονται (συνήθως μεθυλιώνονται) στο λεπτό έντερο και αργότερα στο ήπαρ, μια διαδικασία μεταβολικής αποτοξίνωσης που διευκολύνει τη αποβολή με τα ούρα ³⁹⁶. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, η βιοδιαθεσιμότητα είναι πολύ χαμηλότερη λόγω της διαδικασίας εστεροποίησης ³⁹⁷. Μέχρι σήμερα, μόνο μία μελέτη διερεύνησε τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών του μελιού του φαγόπυρου σε υγιή ανθρώπους. Δύο τύποι μελιού φαγόπυρου σε δόσεις 1,5 mg/kg (που περιείχαν 0,796 και 1,716 mg φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο) χορηγήθηκαν συμπληρωματικά σε

σαράντα άτομα. Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά μαζί με την αντιοξειδωτική και αναγωγική ικανότητα του πλάσματος αυξήθηκαν σημαντικά 2 ώρες μετά τη κατανάλωση του μελιού και παρέμειναν υψηλά έως και 6 ώρες αργότερα υποστηρίζοντας ότι οι φαινολικές ενώσεις του μελιού δεν είναι μόνο βιοδιαθέσιμες αλλά και παρουσιάζουν ελκυστική αντιοξειδωτική δράση για την επαγωγή αμυντικών μηχανισμών κατά του οξειδωτικού στρες ³⁹⁸.

Στο 2^ο στάδιο της μελέτης αξιολογήθηκε η ικανότητα των επιλεγμένων μετα το 1^ο στάδιο αναλύσεων μελιών να μεταβάλλουν δείκτες που σχετίζονται με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις σε 3 κυτταρικές σειρές. Μετά την δοκιμασία XTT επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις εκείνες των δειγμάτων που επηρέαζαν τον πληθυσμό σε σημείο που μπορεί να προσδιορισθεί εάν το κύτταρο θα μπορέσει να κάνει κάποια προσαρμογή επάγοντας αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, χωρίς να προχωρήσει σε μηχανισμούς όπως η απόπτωση. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η κυτταρική σειρά RAW264.7 ήταν αυτή που παρουσίασε τις περισσότερες μεταβολές μετά την έκθεση στα μέλια. Στην ίδια κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε ένα μοτίβο απόκρισης ανά δείκτη και ανεξαρτήτως είδους μελιού αφού η προσθήκη του μελιού φαίνεται να ενεργοποιεί τους προσαρμοστικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Αυτή η ομοιογένεια των αποτελεσμάτων δεν αποτυπώνεται και στα κύτταρα MKN45, αφού φαίνεται ότι το κάθε μέλι είχε διαφορετική απόκριση στους δείκτες. Εξετάσθηκαν 3 κυτταρικές σειρές καθώς είναι αρκετά σύνηθες τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν παραλλακτικότητα ^{111,116}.

Παρά το γεγονός ότι το μέλι είναι γνωστό για τις ιδιότητές του η γνώση γύρω από τον τρόπο δράσης του είναι περιορισμένη λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους. Στην βιβλιογραφία οι μελέτες για το μέλι συνοδεύονται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα από στοιχεία που έχουν να κάνουν με την περιοχή που συλλέγεται. Παράγοντες όπως η τοποθεσία, οι κλιματικές συνθήκες, η σύσταση του εδάφους και το είδος των φυτών στο περιβάλλον γύρω από τα μελίσσια επηρεάζουν το παραγόμενο μέλι και εντείνουν τις διαφορές ακόμη και μεταξύ μελιών του ίδιου είδους ³⁹⁹. Η παγκόσμια βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι τα μέλια με διαφορετικές ανθικές πηγές έχουν διαφορετικό βιοχημικό προφίλ ⁴⁰⁰. Υπάρχει μελέτη που υποστηρίζει πως είναι δυνατόν ακόμη και μέλια με την ίδια ανθική πηγή αλλά από κυψέλες σε διαφορετικές τοποθεσίες να διαφέρουν ανάλογα με τη σύνθεσή τους ²³⁴. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Διατριβής αφού τα δύο Ανθόμελα είχαν διαφορετική απόκριση

στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης παρά το γεγονός ότι ανήκουν στον ίδιο τύπου μελιού. Εκτός από την ανθική πηγή και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι τεχνικές παραγωγής που χρησιμοποιούν οι μελισσοκόμοι και οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν επίσης τη σύσταση του τελικού προϊόντος⁴⁰¹. Σε μελέτη που εξετάστηκαν 30 τύποι μελιού, σε πέντε υποομάδες, από δύο διαφορετικές χώρες. Προκειμένου να εξαλειφθεί ο παράγοντας της ανθικής προέλευσης, τα μέλια ήταν του ίδιου τύπου και από τις δύο χώρες. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι δείγματα της ίδιας ποικιλίας, αλλά από διαφορετική χώρα, παρουσίαζαν διαφοροποίηση στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα αποδεικνύοντας τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση²⁹¹.

Οι διαφορές στον τύπο μελιού αποτυπώνονται τόσο στην σύσταση όσο και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά όπως είναι η γεύση, η ρευστότητα και η απόχρωση¹⁴³. Μελέτη σχετικά με το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και την ένταση του χρώματος διαφόρων τύπων μελιού της Μαλαισίας ανέφερε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της έντασης του χρώματος του μελιού, όπου το μέλι Kelulut που είναι πιο σκούρο είχε την υψηλότερη τιμή TPC 784,3 mg GAE/kg και μέλια με πιο ανοιχτές αποχρώσεις, όπως το Tualang, το Pineapple και το Borneo, είχαν τιμές TPC 589,2, 602,4 και 510,4 mg GAE/kg, αντίστοιχα⁴⁰². Το μέλι Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς είναι το μέλι της Διατριβής με τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις λόγω των μελιτωμάτων. Ειδικότερα, χαρακτηρίζεται από το σκούρο χρώμα του και έχει διαφορετική σύνθεση λόγω των φυτικών και εντομολογικών εκκρίσεων. Ορισμένες φαινολικές ενώσεις, όπως η μυρικετίνη και η πινομπανκσίνη, ανιχνεύονται μόνο στα μέλια μελιτώματος²³⁰. Προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει το σκούρο χρώμα του μελιού με την υψηλότερη ποσότητα φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με τα μέλια νέκταρ^{403,404}. Στην παρούσα μελέτη, το συγκεκριμένο δείγμα μελιού άσκησε ευεργετικές επιδράσεις στις σειρές RAW264.7 και MKN45 βελτιώνοντας τους δείκτες που αξιολογήθηκαν, ενώ ξεχώρισε και στις *in vitro* cell-free δοκιμασίες. Αν και έχει ιδιαίτερα διαφορετική διατροφική αξία, καθώς του αποδίδονται υψηλότερες αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σε σύγκριση με το μέλι ανθέων⁴⁰⁵, ο συγκεκριμένος τύπος μελιού εξακολουθεί να είναι λιγότερο μελετημένος και λιγότερο γνωστός στους καταναλωτές παρά τις προσπάθειες που γίνονται τα τελευταία χρόνια για την ανάδειξη του. Η αυθεντικότητα του μελιού μελιτώματος δεν είναι εύκολη διαδικασία αφού η

γυρεοσκοπική ανάλυση, η οποία βασίζεται στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ποσοστού της γύρης με μικροσκοπική εξέταση, είναι παραδοσιακά αποδεκτή για την εξακρίβωση της προέλευσης των ανθέων του μελιού ⁴⁰⁶. Στην Ευρώπη, το μελίτωμα προέρχεται κυρίως από δέντρα σε ορεινές περιοχές, μέσω των εκκρίσεων που παράγονται από μελιτοφόρα έντομα, σε κωνοφόρα δέντρα. Στις μη ορεινές περιοχές, χρησιμοποιούνται φυτικές εκκρίσεις που παράγονται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού βελανιδιών σε αειθαλείς και φυλλοβόλες βελανιδιές ⁴⁰⁷.

Εκτός από τα μέλια Δάσους, Δάσους με μελιτώματα Βελανιδιάς, και το μέλι Βελανιδιάς μπορεί να κατηγοριοποιηθεί μαζί τους αφού οι Βελανιδιές ευδοκιμούν σε υψόμετρα μεγαλύτερα των 700 μέτρων ¹⁴³. Επιπλέον το μέλι που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της γέλης που εξετάστηκε στην παρούσα Διατριβή είναι Ελάτου και συγκαταλέγεται στην κατηγορία των μελιών Δάσους. Στα μέλια της κατηγορίας παρατηρήθηκε υψηλότερη ικανότητα απόκρισης σε όλους τους εξεταζόμενους δείκτες καθώς και στην πιλοτική κλινική μελέτη. Μελέτη που εξέτασε 100 μέλια εκ των οποίων τα 22 ήταν Δάσους, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα μέλια αυτής της κατηγορίας είχαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Ειδικότερα, τα μέλια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ρίζα DPPH, ενώ προσδιορίστηκε και το περιεχόμενο τους σε φλαβονοειδή και πολυφαινόλες. Παράλληλα προέκυψε ισχυρή συσχέτιση της δοκιμής DPPH με την περιεκτικότητα σε πολυαφινόλες και φλαβονοειδή, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα Διατριβή ⁴⁰⁸. Οι Jasna Bertoneclj et al, έλεγξαν μέλια που παράχθηκαν στη Σλοβενία στις ίδιες μεθόδους καταλήγοντας επίσης στα ίδια συμπεράσματα ως προς τα δείγματα μελιού που χαρακτηρίζονται ως δάσους. Ξεχωριστά μετρήθηκαν δείγματα μελιού καστανιάς και ελάτου, όπου παρατηρήθηκε δράση όμοια με αυτή των μελιών δάσους ⁴⁰⁹. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν μελέτες που χαρακτηρίζουν τα μέλια ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, είναι λίγες εκείνες που τα εξετάζουν σε in vivo μοντέλα και ακόμη λιγότερες εκείνες που συμπεριλαμβάνουν ανθρώπους. Τα αποτελέσματα της Διατριβής επιβεβαιώνουν τους ισχυρισμούς της βιβλιογραφίας περί ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης, αφού βελτίωσαν τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες που εξετάστηκαν. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι εθελοντές δεν είχαν κάποια υποκείμενη ασθένεια ούτε κάποιον περιορισμό κατά την διάρκεια κατανάλωσης της γέλης, χρησιμοποιώντας την ουσιαστικά σαν συμπλήρωμα διατροφής. Τα θετικά αυτά

αποτελέσματα ίσως να οφείλονται στον τύπο μελιού που επιλέχθηκε καθώς και στην υψηλή περιεκτικότητα της γέλης σε γύρη.

Εν κατακλείδι, από την Διατριβή επιβεβαιώθηκε η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όπως αυτό προέκυψε από τις *in vitro* cell free μεθόδους, καθώς και από τις *in vitro* μεθόδους σε κυτταρικά συστήματα, επιβεβαιώνοντας τον πολλά υποσχόμενο ρόλο του μελιού στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Τον ισχυρισμό αυτό επιβεβαιώνει και το *in vivo* πείραμα της μελέτης από το οποίο προέκυψαν επίσης θετικές μεταβολές στους δείκτες που εξετάστηκαν. Παρά τα θετικά αποτελέσματα, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μελιού καθώς πρόκειται για ένα πολύ σύνθετο μίγμα με υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των ειδών του.

...the end.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**, 11 (2015).
2. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., E. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 1999).
3. W, D. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95 (2002).
4. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. *Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press, 2015). doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
5. Fang, Y. Z., Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872–879 (2002).
6. Halliwell, B. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1341–1348 (1995).
7. Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M. & Kouretas, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* **17**, 11–21 (2012).
8. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* (2010) doi:10.4103/0973-7847.70902.
9. Steinbacher, P. & Eckl, P. Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomol.* 2015, Vol. 5, Pages 356-377 **5**, 356–377 (2015).
10. Bielski, B. H. J. & Cabelli, D. E. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. *ChemInform* 66–104 (1995) doi:10.1007/978-94-007-0874-7_3.
11. Staerck, C. *et al.* Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb. Pathog.* **110**, 56–65 (2017).
12. The structure of nitric oxide synthase.
13. Pitt, A. R. & Spickett, C. M. Mass spectrometric analysis of HOCl- and free-radical-induced damage to lipids and proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1077–1082 (2008).
14. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
15. Cheng, J. *et al.* Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **982**, (2017).
16. Cadenas, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1859**, 940–950 (2018).
17. Sousa, J. S., D’Imprima, E. & Vonck, J. Mitochondrial respiratory chain complexes. *Subcell. Biochem.* **87**, 167–227 (2018).
18. Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L. & Yu, Z. Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* **44**, 3–15 (2019).

19. Kuppusamy, P. & Zweier, J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880–9884 (1989).
20. Choi, E. Y., Stockert, A. L., Leimkühler, S. & Hille, R. Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 841–848 (2004).
21. Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F. & Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* **275**, 3278–3289 (2008).
22. Houston, M. *et al.* Binding of Xanthine Oxidase to Vascular Endothelium: KINETIC CHARACTERIZATION AND OXIDATIVE IMPAIRMENT OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **274**, 4985–4994 (1999).
23. Magnani, F. & Mattevi, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **59**, 91–97 (2019).
24. Nguyen, G. T., Green, E. R. & Mecsas, J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 264679 (2017).
25. Robinson, J. M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. doi:10.1007/s00418-008-0461-4.
26. Puntarulo, S. & Cederbaum, A. I. Production of Reactive Oxygen Species by Microsomes Enriched in Specific Human Cytochrome P450 Enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1324–1330 (1998).
27. Schieber, M. & Chandel, N. S. Review ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* **24**, 453–462.
28. Skaperda, Z., Tekos, F., Vardakas, P., Nepka, C. & Kouretas, D. Reconceptualization of Hormetic Responses in the Frame of Redox Toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 23 (2022).
29. Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. & Viña, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. (2007) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001.
30. Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K. & Yadav, U. C. S. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies ☆. (2016) doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.
31. Sosa, V. *et al.* Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376–390 (2013).
32. Elnakish, M. T., Hassanain, H. H., Janssen, P. M., Angelos, M. G. & Khan, M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J. Pathol.* **231**, 290–300 (2013).
33. Gaki, G. S. & Papavassiliou, A. G. Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. doi:10.1007/s12017-014-8294-x.
34. Pomatto, L. C. D. & Davies, K. J. A. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic. Biol. Med.* **124**, 420–430 (2018).
35. Collin, F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in

- Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 2407 **20**, 2407 (2019).
36. Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 4642 **22**, 4642 (2021).
 37. Mailloux, R. J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. doi:10.3390/antiox9060472.
 38. Sies, H. & Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020 217 **21**, 363–383 (2020).
 39. Allan Butterfield, D. *et al.* Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-tert-Butyl-phenylnitron and Vitamin E a. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09924.x.
 40. Stadtman, E. R. & Berlett, B. S. Drug Metabolism Reviews Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease REACTIVE OXYGEN-MEDIATED PROTEIN OXIDATION IN AGING AND DISEASE. *DRUG Metab. Rev.* **30**, 225–243 (1998).
 41. Renke, J., Popadiuk, S., Korzon, M., Bugajczyk, B. & Woźniak, M. X. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 101–104 (2000).
 42. Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease,. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 790–796 (2002).
 43. Leeuwenburgh, C., Hansen, P. A., Holloszy, J. O. & Heinecke, J. W. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 186–192 (1999).
 44. Szweda, P. A., Friguet, B. & Szweda, L. I. Proteolysis, free radicals, and aging,. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 29–36 (2002).
 45. Guéraud, F. *et al.* Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **44**, 1098–1124 (2010).
 46. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
 47. Marnett, L. J. & Hancock, A. B. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95 (1999).
 48. Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 89 (2008).
 49. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* **111**, 5944–5972 (2011).
 50. SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress* 1–8 (1985) doi:10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3.
 51. Jones, D. P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* **8**, 1865–1879 (2006).

52. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–748 (2017).
53. Sies, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91**, S31–S38 (1991).
54. Bhatia, V. & Sharma, S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **421**, 117253 (2021).
55. Cederbaum, A. I. Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Subcell. Biochem.* **67**, 105–130 (2013).
56. García, N., Zazueta, C. & Aguilera-Aguirre, L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
57. Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, E., Boczkowski, J. & Bonay, M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol. Med.* **17**, 363–371 (2011).
58. Chen, Z. & Zhong, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **30**, 271–281 (2014).
59. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **4**, 180–183 (2015).
60. Siegrist, J. & Sies, H. Disturbed Redox Homeostasis in Oxidative Distress: A Molecular Link from Chronic Psychosocial Work Stress to Coronary Heart Disease? *Circ. Res.* **121**, 103–105 (2017).
61. Niki, E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch. Biochem. Biophys.* **595**, 19–24 (2016).
62. Yan, L. J. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* **2**, 165–169 (2014).
63. Sies, H. Oxidative stress: Eustress and distress in redox homeostasis. *Stress Physiol. Biochem. Pathol. Handb. Stress Ser. Vol. 3* 153–163 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.
64. Mitsuishi, Y., Motohashi, H. & Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* **2**, (2012).
65. Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H. & Levonenn, A. L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* **1**, 45–49 (2013).
66. Baird, L. & Yamamoto, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. (2020) doi:10.1128/MCB.00099-20.
67. Cuadrado, A. *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018 184 18**, 295–317 (2019).
68. Wu, K. C., Cui, J. Y. & Klaassen, C. D. Beneficial Role of Nrf2 in Regulating NADPH Generation and Consumption. *Toxicol. Sci.* **123**, 590–600 (2011).
69. Ngo, V. & Duennwald, M. L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants* **11**, (2022).
70. Geertsema, S. *et al.* The NRF2/Keap1 pathway as a therapeutic target in inflammatory

- bowel disease. *Trends Mol. Med.* **29**, 830–842 (2023).
71. Calabrese, E. J. & Baldwin, L. A. The Frequency of U-Shaped Dose Responses in the Toxicological Literature. *Toxicol. Sci.* **62**, 330–338 (2001).
 72. Greenwood, S. N., Belz, R. G. & Weiser, B. P. Dose-Response: An International Journal. 1–11 doi:10.1177/15593258221109335.
 73. Mattson, M. P. Awareness of Hormesis Will Enhance Future Research in Basic and Applied Neuroscience. *Crit. Rev. Toxicol.* **38**, 633–639 (2008).
 74. Calabrese, V. *et al.* Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 753–783 (2012).
 75. Calabrese, E. J., Mattson, M. P. & Calabrese, V. Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.* **29**, 980–1015 (2010).
 76. Calabrese, E. J., Dhawan, G., Kapoor, R., Mattson, M. P. & Rattan, S. I. Curcumin and hormesis with particular emphasis on neural cells. *Food Chem. Toxicol.* **129**, 399–404 (2019).
 77. Fang, E. F. *et al.* Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/ Nrf2 pathway OPEN. (2017) doi:10.1038/srep46208.
 78. Varela-López, A. *et al.* Dietary antioxidants and lifespan: Relevance of environmental conditions, diet, and genotype of experimental models. *Exp. Gerontol.* **178**, 112221 (2023).
 79. Jodynis-liebert, J. & Kujawska, M. Biphasic Dose-Response Induced by Phytochemicals: Experimental Evidence. *J. Clin. Med.* 2020, Vol. 9, Page 718 **9**, 718 (2020).
 80. Ali, S. *et al.* Healthy ageing and Mediterranean diet: A focus on hormetic phytochemicals. *Mech. Ageing Dev.* **200**, (2021).
 81. Bondy, S. C. The Hormesis Concept: Strengths and Shortcomings. *Biomolecules* **13**, 1–10 (2023).
 82. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861–2873 (2007).
 83. Chang, K. C. *et al.* The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell Biosci.* **12**, 1–20 (2022).
 84. Kaur, D. & Deshmukh, R. Physiology of cellular demise: Apoptosis, necrosis, and autophagy. *Clin. Perspect. Target. Ther. Apoptosis Drug Discov. Drug Deliv. Dis. Prev.* 23–78 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-815762-6.00002-0.
 85. Scimè, A., Cheung, T. H., Kong, H., Nakamura-Ishizu, A. & Chang, N. C. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. (2020) doi:10.3389/fcell.2020.00138.
 86. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
 87. Green, D. R. & Llabji, F. Cell Death Signaling. doi:10.1101/cshperspect.a006080.
 88. Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. Cell Death and Repair in Lung Disease. *Pathobiol. Hum. Dis. A Dyn. Encycl. Dis. Mech.* 2558–2574 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-386456-

- 7.05302-8.
89. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663–669 (2004).
 90. D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582–592 (2019).
 91. de Oliveira Silva, E. & Batista, R. Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 580–616 (2017).
 92. Christodoulou, M. C. *et al.* Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants* **11**, (2022).
 93. Willcox, J. K., Ash, S. L. & Catignani, G. L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 275–295 (2004).
 94. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* **54**, 287–293 (2018).
 95. Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K. & Margis-Pinheiro, M. Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. *FEBS J.* **275**, 3959–3970 (2008).
 96. Couto, N., Wood, J. & Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 27–42 (2016).
 97. Niki, E. *et al.* Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 2191–2196 (1985).
 98. Aw, T. Y. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* **18**, 201–204 (2003).
 99. Tsugawa, S. *et al.* Glutathione levels and activities of glutathione metabolism enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *J. Psychopharmacol.* **33**, 1199–1214 (2019).
 100. Minich, D. M. & Brown, B. I. A Review of Dietary (Phyto)Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients* **11**, 2073 (2019).
 101. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **134**, 489–492 (2004).
 102. Pehlivan, F. E. & Pehlivan, F. E. Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitam. C* (2017) doi:10.5772/INTECHOPEN.69660.
 103. Traber, M. G. & Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 4–15 (2007).
 104. Boban, M. & Modun, D. Uric Acid and Antioxidant Effects of Wine. *Croat. Med. J.* **51**, 16 (2010).
 105. Sautin, Y. Y. & Johnson, R. J. URIC ACID: THE OXIDANT–ANTIOXIDANT PARADOX. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 608 (2008).
 106. Vukovic, J. *et al.* Acute, food-induced moderate elevation of plasma uric acid protects against hyperoxia-induced oxidative stress and increase in arterial stiffness in healthy

- humans. *Atherosclerosis* **207**, 255–260 (2009).
107. Glantzounis, G. K., Tsimoyiannis, E. C., Kappas, A. M. & Galaris, D. A. Uric Acid and Oxidative Stress. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 4145–4151 (2005).
 108. Zagorskina, N. V. *et al.* Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
 109. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270 (2009).
 110. Karydas, C. *et al.* Prediction of Antioxidant Activity of Cherry Fruits from UAS Multispectral Imagery Using Machine Learning. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **9**, (2020).
 111. Kouka, P. *et al.* Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncol. Rep.* **42**, 2814–2825 (2019).
 112. Tekos, F. *et al.* Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metab. 2021, Vol. 11, Page 436* **11**, 436 (2021).
 113. D'Archivio, M., Filesì, C., Vari, R., Scazzocchio, B. & Masella, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1321 (2010).
 114. Costa, C. *et al.* Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. (2017) doi:10.1016/j.fct.2017.10.023.
 115. Kouka, P. *et al.* The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin olive oils is correlated with their antioxidant potency. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
 116. Priftis, A. *et al.* Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food Chem. Toxicol.* **114**, 119–127 (2018).
 117. Eran Nagar, E., Okun, Z. & Shpigelman, A. In vitro bioaccessibility of polyphenolic compounds: The effect of dissolved oxygen and bile. *Food Chem.* **404**, 134490 (2023).
 118. Zhang, H. & Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 33–42 (2016).
 119. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278 (2009).
 120. Kumar, N. & Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. (2019) doi:10.1016/j.btre.2019.e00370.
 121. Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K. & Karjalainen, R. O. Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, (2015).
 122. Teka, T. *et al.* Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review. *Phytochemistry* **197**, 113128 (2022).
 123. Peterson, J. *et al.* Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* **68**, 571 (2010).

124. Ullah, A. *et al.* molecules Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. doi:10.3390/molecules25225243.
125. Halliwell, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 637–644 (2013).
126. Kaikkonen, J. *et al.* Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radic. Res.* **35**, 967–978 (2001).
127. Hercberg, S. *et al.* The SU.VI.MAX Study: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Health Effects of Antioxidant Vitamins and Minerals. *Arch. Intern. Med.* **164**, 2335–2342 (2004).
128. Fang, J. C. *et al.* Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet* **359**, 1108–1113 (2002).
129. Dietrich, M. *et al.* Does γ -Tocopherol Play a Role in the Primary Prevention of Heart Disease and Cancer? A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **25**, 292–299 (2006).
130. Jackson, L. *et al.* The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. (2007) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.019.
131. Morrow, J. D. Quantification of Isoprostanes as Indices of Oxidant Stress and the Risk of Atherosclerosis in Humans. (2005) doi:10.1161/01.ATV.0000152605.64964.c0.
132. Cangemi, R. *et al.* Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E. doi:10.1093/eurheartj/ehm565.
133. Keane, J. F. *et al.* Obesity and Systemic Oxidative Stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 434–439 (2003).
134. Devries, M. C. *et al.* Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 503–511 (2008).
135. Rohrseitz, K. & Tautz, J. Honey bee dance communication: waggle run direction coded in antennal contacts?
136. DAMS, M., DAMS, L. Spanish rock art depicting honey gathering during the Mesolithic. *Nature* 228–230 (1977).
137. Traynor, K. S. *et al.* Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* **47**, 325–347 (2016).
138. Bloch, G. *et al.* Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11240–11244 (2010).
139. Anderson-Stojanovic, V. R. & Jones, J. E. Ancient Beehives from Isthmia. *Hesperia* **71**, 345 (2002).
140. Harissis, H. Apiculture in the Prehistoric Aegean. Minoan and Mycenaean Symbols Revisited. *Br. Archaeological Reports* (2009).
141. Kasangaki, P., Chemurot, M., Sharma, D. & Kumar Gupta, R. Beehives in the world. *Beekeep. Poverty Alleviation Livelihood Secur. Vol. 1 Technol. Asp. Beekeep.* 125–170 (2014) doi:10.1007/978-94-017-9199-1_4.

142. Βασίλης, Λ. *Επιχειρηματική Μελισσοκομία*. (2005).
143. Henri Clement. *Le Traite Rustica de la Apiculture*. (Editions Rustica/FLER, 2017).
144. Χαριζάνης Παναγιώτης. *Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική*. (Μελισσοκομική Επιθεώρηση Ν. Παππάς, 1996).
145. Stork, N. E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 31–45 (2018).
146. Ebru Halvaci, K., Teslime, Mert, G., Hatice, K. & ŞEN, F. Bee anatomy: a comprehensive overview of bee morphology and physiology. *J. Sci. Reports-B* **8**, 1–19 (2023).
147. Kakhramanov, B., Isamukhamedov, S., Safarova, F., Donaev, K. & Mamadov, F. Morphological features of the Carniolan (*Apis mellifera carnica* Pollm) and Carpathian (*Apis mellifera carpatica*) breeds of honey bees. *E3S Web Conf.* **284**, (2021).
148. Almeida, E. A. *et al.* The evolutionary history of bees in time and space. (2023) doi:10.1016/j.cub.2023.07.005.
149. Bridges, A. R. & Owen, M. D. The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. *J. Morphol.* **181**, 69–86 (1984).
150. Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euán, J. G. & Oldroyd, B. P. The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization event across time. *Evolution (N. Y.)* **56**, 1462–1474 (2002).
151. Pinto, M. A., Rubink, W. L., Coulson, R. N., Patton, J. C. & Johnston, J. S. Temporal pattern of Africanization in a feral honeybee population from Texas inferred from mitochondrial DNA. *Evolution (N. Y.)* **58**, 1047–1055 (2004).
152. Seeley, T. D., Seeley, R. H. & Akatanakul, P. COLONY DEFENSE STRATEGIES OF THE HONEYBEES IN THAILAND 1. *Ecol. Monogr.* **52**, 43–63 (1982).
153. Haddad, L. S., Kelbert, L. & Hulbert, A. J. Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Exp. Gerontol.* **42**, 601–609 (2007).
154. Remolina, S. C. & Hughes, K. A. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age (Omaha)* **30**, 177 (2008).
155. Tarpy, D. R. & Page, J. No Behavioral Control over Mating Frequency in Queen Honey Bees (*Apis mellifera* L.): Implications for the Evolution of Extreme Polyandry. <https://doi.org/10.1086/303358> **155**, 820–827 (2000).
156. Sammataro, D., Avitabile, A. & Caron, D. M. (Dewey M. *The beekeeper's handbook*. (1998).
157. Collins, A. M. ARTHROPOD BIOLOGY.
158. Martin, N., Hulbert, A. J., Bicudo, J. E. P. W., Mitchell, T. W. & Else, P. L. The adult lifespan of the female honey bee (*Apis mellifera*): Metabolic rate, AGE pigment and the effect of dietary fatty acids. *Mech. Ageing Dev.* **199**, 111562 (2021).
159. Παπαδόπουλος, Η. *Μέλισσα: εκτροφή και νοσήματα*. (Σύγχρονη Παιδεία, 2014).
160. Zullkiflee, N., Taha, H. & Usman, A. Propolis: Its Role and Efficacy in Human Health and Diseases. *Molecules* **27**, 6120 (2022).

161. Samarghandian, S., Farkhondeh, T. & Samini, F. Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Research* vol. 9 121–127 (2017).
162. Anjum, S. I. *et al.* Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**, 1695–1703 (2019).
163. Kumar, R., Thakur, A., Kumar, S. & Hajam, Y. A. Royal jelly a promising therapeutic intervention and functional food supplement: A systematic review. *Heliyon* **10**, e37138 (2024).
164. Jasicka-Misiak, I., Gruyaert, S., Poliwoda, A. & Kafarski, P. Chemical Profiling of Polyfloral Belgian Honey: Ellagic Acid and Pinocembrin as Antioxidants and Chemical Markers. *J. Chem.* **2017**, (2017).
165. Clarke, D., Morley, E. & Robert, D. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **203**, 737–748 (2017).
166. Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. & Olczyk, K. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, (2015).
167. Di Pasquale, G. *et al.* Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One* **8**, e72016 (2013).
168. Sattler, J. A. G. *et al.* Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Res. Int.* **77**, 82–91 (2015).
169. Thakur, M., Singh, K. & Khedkar, R. Phytochemicals: Extraction process, safety assessment, toxicological evaluations, and regulatory issues. *Funct. Preserv. Prop. Phytochem.* 341–361 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-818593-3.00011-7.
170. Campos, M. G. R. *et al.* Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res.* **47**, 154–161 (2008).
171. Mărgăoan, R. *et al.* Monofloral Honeys as a Potential Source of Natural Antioxidants, Minerals and Medicine. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 1023* **10**, 1023 (2021).
172. Alexandre Machado De-Melo, A. *et al.* Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. (2015) doi:10.1016/j.lwt.2015.09.014.
173. Ghosh, S. & Jung, C. Nutritional value of bee-collected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus* sp. (Fagaceae). (2017) doi:10.1016/j.aspen.2017.01.009.
174. Dimou, M., Tananaki, C., Liolios, V. & Thrasyvoulou, A. Pollen foraging by honey bees (*Apis mellifera* L.) in Greece: Botanical and geographical origin. *J. Apic. Sci.* **58**, 11–23 (2014).
175. Chantarudee, A. *et al.* Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complement. Altern. Med.* **12**, 1–12 (2012).
176. Algethami, J. S. *et al.* Bee Pollen: Clinical Trials and Patent Applications. *Nutr.* **2022**, Vol. 14, Page 2858 **14**, 2858 (2022).

177. Thakur, M. & Nanda, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **98**, 82–106 (2020).
178. Sforcin, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phyther. Res.* **30**, 894–905 (2016).
179. Ahangari, Z., Naseri, M. & Vatandoost, F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran. Endod. J.* **13**, 285 (2018).
180. Przybyłek, I. & Karpiński, T. M. Antibacterial Properties of Propolis. *Mol.* 2019, Vol. 24, Page 2047 **24**, 2047 (2019).
181. Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees*. *Apidologie* **41**, 295–311 (2010).
182. Hossain, R. *et al.* Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Med.* 2022 171 **17**, 1–60 (2022).
183. Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2**, 29 (2005).
184. Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. & Suzuki, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem.* **80**, 29–33 (2003).
185. Wang, K. *et al.* Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type). *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, (2013).
186. Irigoiti, Y. *et al.* The use of propolis as a functional food ingredient: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **115**, 297–306 (2021).
187. Šuran, J. *et al.* Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Mol.* 2021, Vol. 26, Page 2930 **26**, 2930 (2021).
188. Nong, Y. *et al.* A review of the use of beeswax in skincare. *J. Cosmet. Dermatol.* **22**, 2166–2173 (2023).
189. Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B. & Felicioli, A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **9**, 839–843 (2016).
190. Guo, J. *et al.* Active components and biological functions of royal jelly. *J. Funct. Foods* **82**, 1756–4646 (2021).
191. Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N. & Gan, S. H. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, (2017).
192. Abd El-Wahed, A. A. *et al.* Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **60**, 459–484 (2019).
193. Kamath, S. D. *et al.* Bee Updated: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. *Front. Immunol.* / www.frontiersin.org **10**, (2019).
194. Lee, K. S., Kim, B. Y., Yoon, H. J., Choi, Y. S. & Jin, R. Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities. (2016) doi:10.1016/j.jdc.2016.05.011.
195. Mohamed, W. A., Abd-Elhakim, Y. M. & Ismail, S. A. A. Involvement of the anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-secretory activity of bee venom in its

- therapeutic effects on acetylsalicylic acid-induced gastric ulceration in rats. (2019) doi:10.1016/j.tox.2019.03.003.
196. Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M. & Mukhtar, H. Mini-review Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. (2017) doi:10.1016/j.canlet.2017.05.010.
 197. Lee, J. E., Shah, V. K., Lee, E. J., Oh, M. S. & Choi, J. J. Melittin – A bee venom component – Enhances muscle regeneration factors expression in a mouse model of skeletal muscle contusion. *J. Pharmacol. Sci.* **140**, 26–32 (2019).
 198. Zhang, S. *et al.* Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. (2018) doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.012.
 199. Nguyen, H. T. L., Panyoyai, N., Paramita, V. D., Mantri, N. & Kasapis, S. Physicochemical and viscoelastic properties of honey from medicinal plants. *Food Chem.* **241**, 143–149 (2018).
 200. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. Honey for Nutrition and Health: A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 677–689 (2008).
 201. Deibert, P., König, D., Kloock, B., Groenefeld, M. & Berg, A. Glycaemic and insulinaemic properties of some German honey varieties. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 762–764 (2010).
 202. Ajibola, A., Chamunorwa, J. P. & Erlwanger, K. H. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. (2012).
 203. Zammit Young, G. W. & Blundell, R. A review on the phytochemical composition and health applications of honey. *Heliyon* **9**, e12507 (2023).
 204. Dżugan, M. *et al.* Physicochemical quality parameters, antibacterial properties and cellular antioxidant activity of Polish buckwheat honey. *Food Biosci.* **34**, 100538 (2020).
 205. Acevedo, F. *et al.* Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. *Food Res. Int.* **94**, 20–28 (2017).
 206. Ramli, N. Z., Chin, K. Y., Zarkasi, K. A. & Ahmad, F. A Review on the Protective Effects of Honey against Metabolic Syndrome. *Nutrients* **10**, (2018).
 207. Wusiman, A. *et al.* Immunomodulatory effects of Alhagi honey polysaccharides encapsulated into PLGA nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **211**, 217–226 (2019).
 208. Afrin, S. *et al.* Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: an evidence-based review. *Nutr. Res. Rev.* **33**, 50–76 (2020).
 209. Talebi, M., Talebi, M., Farkhondeh, T. & Samarghandian, S. Molecular mechanism-based therapeutic properties of honey. (2020) doi:10.1016/j.biopha.2020.110590.
 210. Wang, H. *et al.* Composition, functional properties and safety of honey: a review. (2023) doi:10.1002/jsfa.12720.
 211. Wali, A. F. *et al.* Chrysin, an Important Active Ingredient of Honey: Beneficial Pharmacological Activities and Molecular Mechanism of Action. *Ther. Appl. Honey its Phytochem. Vol. 2* 409–432 (2020) doi:10.1007/978-981-15-7305-7_19/FIGURES/3.

212. Mohammed, H. A. *et al.* Chrysin, The Flavonoid Molecule of Antioxidant Interest. (2023) doi:10.1002/slct.202303306.
213. Chen, A. Y. & Chen, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* **138**, 2099 (2013).
214. Xu, D., Hu, M.-J., Wang, Y.-Q. & Cui, Y.-L. molecules Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. doi:10.3390/molecules24061123.
215. Almasaudi, S. The antibacterial activities of honey. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 2188–2196 (2021).
216. Ranneh, Y. *et al.* Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complement. Med. Ther.* **21**, (2021).
217. Yaghoobi, R., Kazerouni, A. & kazerouni, O. Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **8**, 100 (2013).
218. Simon, A. *et al.* Commentary Medical Honey for Wound Care-Still the 'Latest Resort'? **6**, 165–173 (2008).
219. Sarnanta, A., Burden, A. C. & Jones, C. R. Plasma Glucose Responses to Glucose, Sucrose, and Honey in Patients with Diabetes Mellitus: An Analysis of Glycaemic and Peak Incremental Indices. doi:10.1111/j.1464-5491.1985.tb00654.x.
220. Erejuwa, O. O. Effect of honey in diabetes mellitus: matters arising. *J. Diabetes Metab. Disord.* **13**, (2014).
221. Güneş, Ü. Y. & Eşer, I. Effectiveness of a honey dressing for healing pressure ulcers. *J. Wound, Ostomy Cont. Nurs.* **34**, 184–190 (2007).
222. Gheldof, N., Wang, X. H. & Engeseth, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5870–5877 (2002).
223. Olas, B. Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutr. 2020, Vol. 12, Page 283* **12**, 283 (2020).
224. Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D. & Miguel, M. G. Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 449–457 (2014).
225. Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D. & Miguel, M. G. Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Commercial Portuguese Honeys. *J. Food Sci.* **78**, C1159–C1165 (2013).
226. Karabagias, I. K., Dimitriou, E., Kontakos, S. & Kontominas, M. G. Phenolic profile, colour intensity, and radical scavenging activity of Greek unifloral honeys. *Eur. Food Res. Technol.* **242**, 1201–1210 (2016).
227. Abdeltaif, S. A., Sirelkhatim, K. A. & Hassan, A. B. Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan. *Recycl.* **2018, Vol. 3, Page 27** **3**, 27 (2018).
228. Gül, A. & Pehlivan, T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced

- across Turkey. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1056–1065 (2018).
229. Villalpando-Aguilar, J. L. *et al.* Pollen Types Reveal Floral Diversity in Natural Honey from Campeche, Mexico. *Diversity* **14**, (2022).
 230. Seraglio, S. K. T. *et al.* An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res. Int.* **119**, 44–66 (2019).
 231. Jonathan Chessum, K., Chen, T., Hamid, N. & Kam, R. A comprehensive chemical analysis of New Zealand honeydew honey. *Food Res. Int.* **157**, 111436 (2022).
 232. Simova, S., Atanasov, A., Shishinova, M. & Bankova, V. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. (2012) doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.071.
 233. Schievano, E., Finotello, C., Uddin, J., Mammi, S. & Piana, L. Objective Definition of Monofloral and Polyfloral Honey Based on NMR Metabolomic Profiling. (2016) doi:10.1021/acs.jafc.6b00619.
 234. Kaškonien, V. & Venskutonis, P. R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x.
 235. Machado, A. M. *et al.* Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin—A Review on their Occurrence on Monofloral Honey. *Mol.* **2020**, Vol. 25, Page 374 **25**, 374 (2020).
 236. Bogdanov, S., Ruoff, K. & Oddo, L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* **35**, S4–S17 (2004).
 237. Galimberti, A. *et al.* A DNA Barcoding Approach to Characterize Pollen Collected by Honeybees. *PLoS One* **9**, e109363 (2014).
 238. Hawkins, J. *et al.* Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLoS One* **10**, e0134735 (2015).
 239. Khansari, E. *et al.* Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **207**, 203–211 (2012).
 240. Kraaijeveld, K. *et al.* Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. (2014) doi:10.1111/1755-0998.12288.
 241. Balkanska, R., Stefanova, K. & Stoikova-Grigorova, R. Main honey botanical components and techniques for identification: a review. *J. Apic. Res.* **59**, 852–861 (2020).
 242. Sukumaran, A., Khanduri, V. P. & Sharma, C. M. Pollinator-mediated self-pollination and reproductive assurance in an isolated tree of *Magnolia grandiflora* L. doi:10.1186/s13717-020-00254-5.
 243. García-Breijo, F. *et al.* In Vivo Pollen Tube Growth and Evidence of Self-Pollination and Prefloral Anthesis in. *Agriculture* (2020).
 244. MacInnis, G. & Forrest, J. R. K. Field design can affect cross-pollination and crop yield in strawberry (*Fragaria x ananassa* D.). *Agric. Ecosyst. Environ.* **289**, 106738 (2020).

245. Lobo, J. A., Quesada, M. & Stoner, K. E. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. *Am. J. Bot.* **92**, 370–376 (2005).
246. Zeng, X. & Fischer, G. A. Wind pollination over 70 years reduces the negative genetic effects of severe forest fragmentation in the tropical oak *Quercus bambusifolia*. *Hered.* 2019 1241 **124**, 156–169 (2019).
247. van der Kooi, C. J. & Ollerton, J. The origins of flowering plants and pollinators. *Science* (80-.). **368**, 1306–1308 (2020).
248. Khalifa, S. A. M. *et al.* Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* **12**, 1–23 (2021).
249. Paschalidis, C. D. *et al.* The Importance of Agricultural Land Used in the Production of Agricultural Products in Greece. *J. Stat. Econom. Methods* 1–14 (2021) doi:10.47260/jsem/1031.
250. EU imported €405.9 million worth in honey in 2021 - Products Eurostat News - Eurostat. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/edn-20220819-2>.
251. Kleisiari, C., Kleftodimos, G. & Vlontzos, G. Be(e)ha(i)viour(e): assessment of honey consumption in Europe. *Br. Food J.* **125**, 1374–1389 (2023).
252. Key facts about Europe's honey market (infographic) | Topics | European Parliament. <https://www.europarl.europa.eu/topics/en/article/20180222STO98435/key-facts-about-europe-s-honey-market-infographic>.
253. Greek honey - the real taste of Greece that we like. <https://livebeekeeping.com/honey/greek-honey/>.
254. Veskoukis, A. *et al.* A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology* vol. 13 99–109 (2019).
255. Kouka, P. *et al.* Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicol. Reports* **7**, 421–432 (2020).
256. Priftis, A. *et al.* Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol. Med. Rep.* **12**, 7293–7302 (2015).
257. Skaperda, Z. *et al.* In vitro antioxidant properties of herb decoction extracts derived from Epirus, Greece . *Int. J. Funct. Nutr.* **2**, 1–13 (2021).
258. Kyriazis, I. D. *et al.* Methodology for the biofunctional assessment of honey (Review). *Int. J. Funct. Nutr.* **2**, 1–11 (2021).
259. Kerasioti, E. *et al.* Antioxidant Effects of Sheep Whey Protein on Endothelial Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
260. Spanou, C. *et al.* Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6967–6976 (2008).
261. Veskoukis, A. S. *et al.* The Antioxidant Effects of a Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus.

- Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 185867 (2012).
262. Kerasiotti, E. *et al.* Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.* **155**, 271–278 (2014).
 263. Spanou, C. *et al.* Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Res.* **27**, 3403–3410 (2007).
 264. Veskoukis, A. S. *et al.* The Antioxidant Effects of a Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 14 (2012).
 265. Apostolou, A. *et al.* Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. *Food Chem. Toxicol.* **61**, 60–68 (2013).
 266. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–178 (1999).
 267. Pérez, M., Dominguez-López, I. & Lamuela-Raventós, R. M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. (2023) doi:10.1021/acs.jafc.3c04022.
 268. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
 269. Beiras, R. Biotransformation. *Mar. Pollut.* 205–214 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-813736-9.00012-X.
 270. Patouna, A., Vardakas, P., Skaperda, Z. O. I., Spandidos, D. A. & Kouretas, D. Evaluation of the antioxidant potency of Greek honey from the Taygetos and Pindos mountains using a combination of cellular and molecular methods. 1–13 (2023) doi:10.3892/mmr.2023.12941.
 271. Gülçin, I., Küfrevioğlu, O. I., Oktay, M. & Büyükkökuroğlu, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.* **90**, 205–15 (2004).
 272. Yen, G. C. & Duh, P. Der. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 629–632 (1994).
 273. Chang, S. T. *et al.* Antioxidant activity of extracts from Acacia confusa bark and heartwood. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3420–3424 (2001).
 274. Fini, L. *et al.* Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **29**, 139–146 (2008).
 275. Kurtagić, H. *et al.* Determination of type of honey produced in the different climatic regions of Bosnia and Herzegovina. doi:10.1007/s13762-016-1101-5.
 276. Mohammed, W., Alaerjani, A., Elimam, M. & Mohammed, A. Impact of floral and geographical origins on honey quality parameters in Saudi Arabian regions. *Sci. Reports* / **14**, 8720 (123AD).

277. Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C. & Restani, P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutr.* **2021**, Vol. 13, Page 273 **13**, 273 (2021).
278. Teng, H. & Chen, L. Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 2040–2051 (2019).
279. Graf, B. A., Milbury, P. E. & Blumberg, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J. Med. Food* **8**, 281–290 (2005).
280. Arts, I. C. W. & Hollman, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, (2005).
281. Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F. & Battino, M. Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Curr. Med. Chem.* **20**, 621–638 (2013).
282. Gheldof, N., Wang, X. H. & Engeseth, N. J. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1500–1505 (2003).
283. Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L. & Ansari, M. J. Role of honey in modern medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 975–978 (2017).
284. Alshammari, G. M. *et al.* Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Ascorbic Acid, and Sugars in Honey from Ingenious Hail Province of Saudi Arabia. *Appl. Sci.* **12**, (2022).
285. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. & Ab Wahab, M. S. Effects of Honey and Its Mechanisms of Action on the Development and Progression of Cancer. *Mol.* **2014**, Vol. 19, Pages 2497-2522 **19**, 2497–2522 (2014).
286. Candiracci, M. *et al.* Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 12304–12311 (2012).
287. Chan, C. W. *et al.* Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole. (2013) doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.092.
288. Sergiel, I., Pohl, P. & Biesaga, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **145**, 404–408 (2014).
289. Puścion-Jakubik, A., Borawska, M. H. & Socha, K. Modern methods for assessing the quality of Bee Honey and botanical origin identification. *Foods* **9**, (2020).
290. Stagos, D. *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 726–734 (2018).
291. Tomczyk, M., Tarapatsky, M. & Dżugan, M. The influence of geographical origin on honey composition studied by Polish and Slovak honeys. *Czech J. Food Sci.* **37** (2019), 232–238 (2019).
292. Platzer, M. *et al.* Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules* **26**, (2021).
293. Nagarajan, J., Ramanan, R. N., Raghunandan, M. E., Galanakis, C. M. &

- Krishnamurthy, N. P. Carotenoids. *Nutraceutical Funct. Food Components Eff. Innov. Process. Tech.* 259–296 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-805257-0.00008-9.
294. Tahirović, I. *et al.* Hydrophilic antioxidant scores against hydroxyl and peroxy radicals in honey samples from Bosnia and Herzegovina. *IFMBE Proc.* **62**, 429–434 (2017).
 295. Chanda, S. & Dave, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties : An overview. *African J. Microbiol. Res.* **3**, 981–996 (2009).
 296. Gül, A. & Pehlivan, T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1056–1065 (2018).
 297. Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. & Hocevar, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **38**, 96–109 (2010).
 298. Kouka, P. *et al.* Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *Int. J. Mol. Med.* **40**, 703–712 (2017).
 299. Stagos, D. *et al.* Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 4115–4124 (2012).
 300. Baek, Y., Kim, Y. J., Baik, M. Y., Kim, D. O. & Lee, H. Total phenolic contents and antioxidant activities of Korean domestic honey from different floral sources. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1453–1457 (2015).
 301. Hailu, D. & Belay, A. Melissopalynology and antioxidant properties used to differentiate *Schefflera abyssinica* and polyfloral honey. *PLoS One* **15**, e0240868 (2020).
 302. Mokaya, H. O., Bargul, J. L., Irungu, J. W. & Lattorff, H. M. G. Bioactive constituents, in vitro radical scavenging and antibacterial activities of selected *Apis mellifera* honey from Kenya. *Int. J. Food Sci. Technol.* **55**, 1246–1254 (2020).
 303. Becerril-sánchez, A. L., Quintero-salazar, B., Dublán-garcía, O. & Escalona-buendía, H. B. Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color. *Antioxidants* **10**, 1700 (2021).
 304. Arango, M.-T., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J. & Montoya-Ortiz, G. Cell culture and cell analysis. (2013).
 305. Wörz, A. Systematics and distribution patterns of the Balkan species of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae). *Phytol. Balc.* **12**, 221–230 (2006).
 306. Verma, R. & Hansch, C. Chemical Toxicity on HeLa Cells. *Curr. Med. Chem.* **13**, 423–448 (2006).
 307. Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F. & Kassie, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* **198**, 329–340 (2004).
 308. Alía, M. *et al.* Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**, 110–118 (2006).
 309. Homma, N. *et al.* Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci.* **97**, 51–56 (2006).

310. Laskin, D. L., Sunil, V. R., Gardner, C. R. & Laskin, J. D. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 267–288 (2011).
311. Huang, H. L. *et al.* Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 36 (2010).
312. Patsoukis, N. *et al.* Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* **357**, 83–86 (2004).
313. Janaszewska, A. & Bartosz, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **62**, 231–236 (2002).
314. Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H. & Akcay, F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* **28**, 141–143 (2001).
315. Lesjak, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Foods* **40**, 68–75 (2018).
316. Donato, M. T., Tolosa, L. & Gómez-Lechón, M. J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protoc. Vitro. Hepatocyte Res.* 77–93 (2015) doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_5/COVER.
317. Skaperda, Z. *et al.* A novel combined bioactivity / chemoactivity holistic approach for the evaluation of dietary supplements. *Food Chem. Toxicol.* **152**, 112159 (2021).
318. Gasparri, M. *et al.* Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food Chem. Toxicol.* **120**, 578–587 (2018).
319. Mumtaz, P. T. *et al.* Antiproliferative and Apoptotic Activities of Natural Honey. *Ther. Appl. Honey its Phytochem. Vol.1* **1**, 345–360 (2020).
320. Waheed, M. *et al.* Honey and cancer: A mechanistic review. *Clin. Nutr.* **38**, 2499–2503 (2019).
321. Othman, N. H. Honey and cancer: Sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2012 (2012).
322. Alvarez-Suarez, J. M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L. & Giampieri, F. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* **3**, 420 (2014).
323. Panieri, E. & Santoro, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* **2016** **7**, e2253–e2253 (2016).
324. Nakamura, H. & Takada, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* **112**, 3945–3952 (2021).
325. Skaperda, Z. *et al.* In vitro antioxidant properties of herb decoction extracts derived from Epirus, Greece. *Int. J. Funct. Nutr.* **2**, (2021).
326. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. *The importance of glutathione in human disease.*

327. Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
328. Jalal, A. *et al.* Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **207**, (2021).
329. Calabrese, E. J. Hormesis: Path and Progression to Significance. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
330. Dey, A., Guha, P., Chattopadhyay, S. & Bandyopadhyay, S. K. Biphasic activity of resveratrol on indomethacin-induced gastric ulcers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 90–95 (2009).
331. Akagawa, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027> **55**, 307–320 (2021).
332. Afrin, S. *et al.* Strawberry tree honey as a new potential functional food. Part 2: Strawberry tree honey increases ROS generation by suppressing Nrf2-ARE and NF- κ B signaling pathways and decreases metabolic phenotypes and metastatic activity in colon cancer cells. *J. Funct. Foods* **57**, 477–487 (2019).
333. Sun, J. *et al.* The clustering status of detached gastric cancer cells inhibits anoikis-induced ferroptosis to promote metastatic colonization. *Cancer Cell Int.* **24**, 1–17 (2024).
334. Li, J. *et al.* Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* **2020 112** **11**, 1–13 (2020).
335. Xu, H. *et al.* Glutathione peroxidase 2 knockdown suppresses gastric cancer progression and metastasis via regulation of kynurenine metabolism. *Oncogene* **2023 4224** **42**, 1994–2006 (2023).
336. Andre, C., Larondelle, Y. & Evers, D. Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 2–12 (2010).
337. Sharma, A., Parikh, M., Shah, H. & Gandhi, T. Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats. *Heliyon* **6**, (2020).
338. Abdel-Latif, M. M. M. & Abouzied, M. M. Molecular Mechanisms of Natural Honey Against *H. pylori* Infection Via Suppression of NF- κ B and AP-1 Activation in Gastric Epithelial Cells. *Arch. Med. Res.* **47**, 340–348 (2016).
339. Hashim, K. N., Chin, K. Y. & Ahmad, F. The mechanism of honey in reversing metabolic syndrome. *Molecules* **26**, (2021).
340. Ahmed, S. *et al.* Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
341. Alvarez-Suarez, J. M. *et al.* Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. *J. Funct. Foods* **25**, 38–49 (2016).
342. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 360438 (2014).

343. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. & Ab Wahab, M. S. Honey - A Novel Antidiabetic Agent. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 913 (2012).
344. Jamurtas, A. Z. *et al.* Effects of Acute Low-Volume HIIT and Aerobic Exercise on Leukocyte Count and Redox Status. *Journal of Sports Science and Medicine* vol. 17 <http://www.jssm.org> (2018).
345. Tofas, T. *et al.* Effects of Cardiovascular, Resistance and Combined Exercise Training on Cardiovascular, Performance and Blood Redox Parameters in Coronary Artery Disease Patients: An 8-Month Training-Detraining Randomized Intervention. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 409 **10**, 409 (2021).
346. Draganidis, D. *et al.* Disparate Habitual Physical Activity and Dietary Intake Profiles of Elderly Men with Low and Elevated Systemic Inflammation. (2018) doi:10.3390/nu10050566.
347. Batrakoulis, A. *et al.* Hybrid neuromuscular training improves cardiometabolic health and alters redox status in inactive overweight and obese women: A randomized controlled trial. *Antioxidants* **10**, 1601 (2021).
348. Pickering, T. G. *et al.* Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals Part 1: Blood Pressure Measurement in Humans A Statement for Professionals From the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. (2005) doi:10.1161/01.CIR.0000154900.76284.F6.
349. Georgakouli, K. *et al.* Exercise and Redox Status Responses Following Alpha-Lipoic Acid Supplementation in G6PD Deficient Individuals. *Antioxidants* 2018, Vol. 7, Page 162 **7**, 162 (2018).
350. Makri, S. *et al.* Novel Feed Including Olive Oil Mill Wastewater Bioactive Compounds Enhanced the Redox Status of Lambs. *In Vivo (Brooklyn)*. **32**, 291 (2018).
351. Reddy, Y. N. M. V. K. R. P. C. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. | IMSEAR. 213–218 <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sea-148251?lang=en> (2004).
352. Veskoukis, A. S., Kyparos, A., Paschalis, V. & Nikolaidis, M. G. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. <http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2015.1126648> **21**, 208–217 (2016).
353. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).
354. Spilioti, E. *et al.* Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece. *PLoS One* **9**, e94860 (2014).
355. Tsavea, E. *et al.* Physicochemical Characterization and Biological Properties of Pine Honey Produced across Greece. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 943 **11**, 943 (2022).
356. Masad, R. J. *et al.* The Immunomodulatory Effects of Honey and Associated Flavonoids in Cancer. *Nutr.* 2021, Vol. 13, Page 1269 **13**, 1269 (2021).
357. Mina Hemmati, Mehdi Karamian & Mohammad Malekaneh. Anti-atherogenic Potential of Natural Honey: Anti-diabetic and Antioxidant Approaches. *J. Pharm. Pharmacol.* **3**, (2015).
358. Kougioumoutzis, K. *et al.* Plant Endemism Centres and Biodiversity Hotspots in Greece. *Biol.* 2021, Vol. 10, Page 72 **10**, 72 (2021).

359. Chau, T., Owusu-Apenten, R. & Nigam, P. Total Phenols, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of Manuka Honey Extract. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* **15**, 1–6 (2017).
360. Puścion-Jakubik, A. *et al.* Comparative Analysis of Antioxidant Properties of Honey from Poland, Italy, and Spain Based on the Declarations of Producers and Their Results of Melissopalinalogical Analysis. *Nutrients* **14**, (2022).
361. Khalil, M. I. & Sulaiman, S. A. The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: A review. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **7**, 315–321 (2010).
362. Laaroussi, H. *et al.* Protective Effect of Honey and Propolis against Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Hepatorenal Damages. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, (2021).
363. Human, H. & Nicolson, S. W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* **67**, 1486–1492 (2006).
364. Mohdaly, A. A. A., Mahmoud, A. A., Roby, M. H. H., Smetanska, I. & Ramadan, M. F. Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *J. Food Biochem.* **39**, 538–547 (2015).
365. Al-Waili, N. *et al.* Honey and Cardiovascular Risk Factors, in Normal Individuals and in Patients with Diabetes Mellitus or Dyslipidemia. <https://home.liebertpub.com/jmf> **16**, 1063–1078 (2013).
366. De Faria, J. B. L., Silva, K. C. & Lopes De Faria, J. M. The contribution of hypertension to diabetic nephropathy and retinopathy: the role of inflammation and oxidative stress. *Hypertens. Res.* **2011 344 34**, 413–422 (2011).
367. Rodrigo, R., González, J. & Paoletto, F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens. Res.* **2011 344 34**, 431–440 (2011).
368. Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. & Ab Wahab, M. S. Honey: A Novel Antioxidant. *Mol.* **2012, Vol. 17, Pages 4400-4423 17**, 4400–4423 (2012).
369. Erejuwa, O. O. *et al.* Differential Responses to Blood Pressure and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar-Kyoto Rats and Spontaneously Hypertensive Rats: Effects of Antioxidant (Honey) Treatment. *Int. J. Mol. Sci* **12**, 1888–1907 (2011).
370. Owomofoyon Erejuwa, O. *et al.* Comparison of Antioxidant Effects of Honey, Glibenclamide, Metformin, and Their Combinations in the Kidneys of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci* **12**, 829–843 (2011).
371. Ahmad, N. S. *et al.* Dose–Response Effect of Tualang Honey on Postprandial Antioxidant Activity and Oxidative Stress in Female Athletes: A Pilot Study. <https://home.liebertpub.com/acm> **23**, 989–995 (2017).
372. Tsikas, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* **524**, 13–30 (2017).
373. Al-Rahbi, B. *et al.* Protective Effects of Tualang Honey against Oxidative Stress and Anxiety-Like Behaviour in Stressed Ovariectomized Rats. (2014) doi:10.1155/2014/521065.

374. Tsamesidis, I. *et al.* Effects of Greek Honey and Propolis on Oxidative Stress and Biochemical Parameters in Regular Blood Donors. *J. Xenobiotics* **12**, 13–20 (2022).
375. Al-Waili, N. S. Effects of Daily Consumption of Honey Solution on Hematological Indices and Blood Levels of Minerals and Enzymes in Normal Individuals. <https://home.liebertpub.com/jmf> **6**, 135–140 (2004).
376. Kander, M. C., Cui, Y. & Liu, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 1024–1032 (2017).
377. Michos, C., Kiortsis, D., Evangelou, A. & Karkabounas, S. Antioxidant protection during the menstrual cycle: The effects of estradiol on ascorbic-dehydroascorbic acid plasma levels and total antioxidant plasma status in eumenorrhoeic women during the menstrual cycle. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **85**, 960–965 (2006).
378. Serviddio, G. *et al.* Modulation of Endometrial Redox Balance during the Menstrual Cycle: Relation with Sex Hormones. *J Clin Endocrinol Metab* vol. 87 <https://academic.oup.com/jcem/article/87/6/2843/2847389> (2002).
379. Prokai-Tatrai, K., Perjesi, P., Rivera-Portalatin, N. M., Simpkins, J. W. & Prokai, L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* **73**, 280–288 (2008).
380. Dantas, A. P. V. *et al.* In Vivo Evidence for Antioxidant Potential of Estrogen in Microvessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **39**, 405–411 (2002).
381. Murphy, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **109**, 687–696 (2011).
382. Viña, J., Borrás, C., Gambini, J., Sastre, J. & Pallardó, F. V. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett.* **579**, 2541–2545 (2005).
383. Bellanti, F. *et al.* Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biol.* **1**, 340–346 (2013).
384. Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C. & Pérez-Coello, M. S. Volatile Composition and Contribution to the Aroma of Spanish Honeydew Honeys. Identification of a New Chemical Marker. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4809–4813 (2006).
385. Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N. & Clarke, A. M. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *Int. J. Mol. Sci* **12**, 9514–9532 (2011).
386. Martinotti, S. & Ranzato, E. Honey, Wound Repair and Regenerative Medicine. *J. Funct. Biomater.* 2018, Vol. 9, Page 34 **9**, 34 (2018).
387. Miguel, M. G., Antunes, M. D. & Faleiro, M. L. Honey as a Complementary Medicine. *Integr. Med. Insights* **12**, 1–15 (2017).
388. Alvarez-Suarez, J. M. *et al.* Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2490–2499 (2010).
389. Oh, B. *et al.* The use and perceived benefits resulting from the use of complementary and alternative medicine by cancer patients in Australia. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **6**, 342–349 (2010).

390. Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. & Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* **196**, 309–323 (2016).
391. Seraglio, S. K. T. *et al.* Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of Mimosa scabrella Benth honeydew honeys. *Food Res. Int.* **99**, 670–678 (2017).
392. Andjelković, M. *et al.* Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* **98**, 23–31 (2006).
393. Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S., Anum, Y. & Yusof, M. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Increase with Gamma Irradiation in Two Types of Malaysian Honey. *Mol.* **2011**, Vol. 16, Pages 6378-6395 **16**, 6378–6395 (2011).
394. Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S. & Toscano, M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6343–6351 (2006).
395. Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X. & Xu, B. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *Int. J. Food Prop.* **22**, 290–308 (2019).
396. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, (2005).
397. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
398. Schramm, D. D. *et al.* Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1732–1735 (2003).
399. Gismondi, A. *et al.* From Robinia pseudoacacia L. nectar to Acacia monofloral honey: biochemical changes and variation of biological properties. (2018) doi:10.1002/jsfa.8957.
400. Ciucure, C. T. & Geană, E. I. Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochem. Anal.* **30**, 481–492 (2019).
401. Soares, S., Pinto, D., Rodrigues, F., Alves, R. C. & Oliveira, M. B. P. P. Portuguese Honeys from Different Geographical and Botanical Origins: A 4-Year Stability Study Regarding Quality Parameters and Antioxidant Activity. *Molecules* **22**, (2017).
402. Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Tan, S. W. & Chua, L. S. Total Phenolic Contents and Colour Intensity of Malaysian Honeys from the Apis spp. and Trigona spp. Bees. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2**, 150–155 (2014).
403. Özcan, M. M. & Ölmez, Ç. Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chem.* **163**, 212–218 (2014).
404. Starowicz, M., Ostaszyk, A., Zielński, H. & Miguel, C. G. The Relationship between the Browning Index, Total Phenolics, Color, and Antioxidant Activity of Polish-Originated Honey Samples Academic Editor: Maria da Graça. (2021) doi:10.3390/foods10050967.
405. Pita-Calvo, C. & Vázquez, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **59**, 79–87 (2017).

406. Aronne, G. & de Micco, V. Traditional melissopalynology integrated by multivariate analysis and sampling methods to improve botanical and geographical characterisation of honeys. *Plant Biosyst.* **144**, 833–840 (2010).
407. Seijo, M. C., Escuredo, O. & Rodríguez-Flores, M. S. Physicochemical Properties and Pollen Profile of Oak Honeydew and Evergreen Oak Honeydew Honeys from Spain: A Comparative Study. *Foods* **2019**, Vol. 8, Page 126 **8**, 126 (2019).
408. Ibrahim, H. & Hajdari, A. Phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Kosovo. *J. Apic. Res.* **59**, 452–457 (2020).
409. Bertonecelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M. & Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* **105**, 822–828 (2007).
410. Οι λίθινες κυψέλες των νησιών της ανατολικής Μεσογείου.
<https://www.archaiologia.gr/blog/2014/10/03/οι-λίθινες-κυψέλες-των-νησιών-της-ανατ/>.