



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση της αντιϊκής δράσης ελληνικών μελιών έναντι του Εντεροϊού D68

Investigation of antiviral activity of Greek honeys against Enterovirus D68



Πτυχιακή εργασία
Δημητριάδου Μαρία του Πέτρου
Λάρισα, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ:

Ε.ΔΙ.Π. ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διερεύνηση της αντιϊκής δράσης ελληνικών μελιών έναντι του Εντεροϊού D68

Investigation of antiviral activity of Greek honeys against Enterovirus D68

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μόσιαλο Δημήτριο για την ανάθεση αυτής της εργασίας και για την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση του κατά την διεξαγωγή της, όπως επίσης και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αμούτζια Γρηγόριο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Στη συνέχεια, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ε.ΔΙ.Π. Δημητρίου Τηλέμαχο για την στήριξη, την υπομονή και τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές του σε όλα τα στάδια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την φιλική διάθεση, την συμπαράσταση και την βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολύπτυχη ευεργετική δράση του μελιού ήταν ευρέως διαδεδομένη ανάμεσα στους αρχαίους πολιτισμούς κι αποτέλεσε αφορμή για την περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων του. Ανάμεσα σε αυτές ξεχωρίζει η συμβολή της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού στην αντιμετώπιση ανθεκτικών μικροβίων, με το μέλι Manuka να έχει τη μεγαλύτερη αναγνώριση και να χρησιμοποιείται συστηματικά στις περισσότερες μελέτες *in vitro*. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης της κυτταροτοξικής δράσης σε κύτταρα RD και της αντιϊκής δράσης, των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού έναντι του EV-D68. Πρόκειται για έναν ιό που πλήττει κυρίως το αναπνευστικό σύστημα των παιδιών κι έχει συνδεθεί σε μεγάλο βαθμό με την εμφάνιση μίας σπάνιας νευρολογικής ασθένειας, της οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM). Η ραγδαία αύξηση των κρουσμάτων του τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό μετάλλαξης του και της απουσίας φαρμακευτικής αγωγής, στρέφει τις έρευνες στην αναζήτηση εναλλακτικών θεραπειών. Στο παρόν πείραμα διερευνάται η ανασταλτική δράση που ασκούν 8 δείγματα μελιού ελληνικής παραγωγής στον ιικό τίτλο του EV-D68, σε συγκεντρώσεις των 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1mg/ml. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση της κυτταροτοξικής και αντιϊκής δράσης των παραπάνω συγκεντρώσεων για κάθε δείγμα μελιού και επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 16, 8 και 4mg/ml, που εμφάνιζαν προστατευτική δράση στα κύτταρα RD, για την μελέτη της αντιϊκής δράσης έναντι του EV-D68. Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση του ιικού RNA γονιδιώματος και αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA μέσω RT-PCR, ώστε να μπορέσει να ενισχυθεί η VP1 περιοχή του με Real-Time PCR. Τέλος, έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} για κάθε μέλι και τον προσδιορισμό της αντιϊκής δράσης έναντι του EV-D68. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT για τον υπολογισμό της τιμής CC_{50} για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας κάθε δείγματος μελιού. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} και CC_{50} που προέκυψαν για κάθε δείγμα μελιού, το μέλι Καστανιάς εμφάνισε σημαντική αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 8,8mg/ml και χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα από το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης, ενώ το μέλι Θυμαριού και Ελάτου εμφάνισε πιο ισχυρή αντιϊκή δράση και πιο υψηλή προστατευτική δράση από το Manuka, ενθαρρύνοντας την περαιτέρω μελέτη του.

ABSTRACT

The multifaceted beneficial effect of honey was widespread among ancient civilizations and was the occasion for further investigation of its properties. Among them, the contribution of the antimicrobial action of honey stands out in the treatment of resistant microbes, with Manuka honey having the greatest recognition and being used systematically in most *in vitro* studies. In the present study it was used as a point of comparison of the cytotoxic activity in RD cells and the antiviral activity of the under study honey samples against EV-D68. It is a virus that mainly affects the respiratory system of children and has been largely associated with the occurrence of a rare neurological disease, acute flaccid myelitis (AFM). The rapid increase in cases in recent years, combined with the high rate of mutation and the absence of medication, is turning research to the search for alternative therapies. The present experiment investigates the inhibitory effect exerted by 8 samples of Greek honey on the viral titer of EV-D68, in concentrations of 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 and 1mg/ml. Specifically, microscopic observation of the cytotoxic and antiviral activity of the above concentrations was performed for each honey sample and the concentrations of 16, 8 and 4mg/ml which showed a protective effect on RD cells, were selected for the study of antiviral activity against EV-D68. The viral RNA genome was then isolated and reverse transcribed into cDNA by RT-PCR, so that its VP1 region could be amplified by Real-Time PCR. Finally, the results of qPCR were analyzed to calculate the IC₅₀ value for each honey and to determine the antiviral activity against EV-D68. At the same time, the MTT method was used to calculate the CC₅₀ value to determine the cytotoxicity of each honey sample. According to the IC₅₀ and CC₅₀ values obtained for each honey sample, Chestnut honey showed significant antiviral activity at a concentration of 8,8mg/ml and lower cytotoxicity than Manuka honey which was used as a point of comparison, while Thyme & Fir honey showed stronger antiviral activity and higher protective action than Manuka, encouraging its further study.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	6
1.1. Τι είναι το μέλι	6
1.2. Η σημασία του μελιού στην αρχαιότητα	7
1.3. Σύσταση, χαρακτηριστικά και ιδιότητες του μελιού	8
1.4. Κατηγοριοποίηση-είδη των μελιών	14
1.5. Μέλι Manuka	17
1.6. Εντεροϊός D68	18
1.7. Κύκλος ζωής του ιού	23
1.8. Παθογένεια του ιού	24
1.9. Επιδημιολογία	26
2. Σκοπός της εργασίας	27
3. Υλικά και μέθοδοι	28
4. Αποτελέσματα	38
5. Συζήτηση	43
6. Βιβλιογραφία	47

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι το μέλι

Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμιγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματος τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67, 2016).

Η δημιουργία του μελιού αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί την συντονισμένη δράση των μελισσών της κυψέλης. Συγκεκριμένα, μια ομάδα μελισσών εργατριών (συλλέκτες) συλλέγουν το νέκταρ των ανθέων και τις εκκρίσεις των μελιτογόνων εντόμων (μελίτωμα), τα οποία αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή του μελιού, και τα αποθηκεύουν στον πρόλοβο του στομάχου τους, μεταφέροντας τα στην κυψέλη [1,2]. Εκεί ακολουθεί η μεταβίβαση της πρώτης ύλης σε μια άλλη ομάδα εργατριών για περαιτέρω επεξεργασία κατά την οποία εκκρίνονται ένζυμα από τους υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας όπως είναι η ιμπερτάση, η οποία μετατρέπει τη σακχαρόζη σε φρουκτόζη και D-γλυκόζη, και η οξειδάση της γλυκόζης, η οποία διασπά τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) [1-3]. Συγχρόνως, με αυτή την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων επιτυγχάνεται η μείωση της περιεκτικότητας σε νερό.

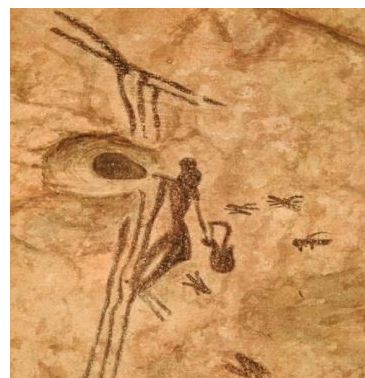
Μόλις ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία, οι μέλισσες διοχετεύουν το επεξεργασμένο νέκταρ στα κέρινα κελιά της κηρήθρας όπου συνεχίζεται η εξάτμιση του νερού μέχρι το μέλι να αποκτήσει περιεκτικότητα 83% περίπου σε σάκχαρα και 17% σε νερό, το οποίο χρειάζεται μερικές μέρες για να γίνει [4]. Η διαδικασία αυτή της ωρίμανσης επιτυγχάνεται με την γρήγορη κίνηση των φτερών των μελισσών για αερισμό της κυψέλης και αύξηση του ρυθμού εξάτμισης του νερού [4]. Τέλος, οι μέλισσες καλύπτουν τα κελιά με ένα στρώμα από κέρι το οποίο αφαιρείται μόνο σε περίπτωση που το χρειαστούν, όταν δηλαδή η αναζήτηση τροφής είναι αδύνατη (λόγω καιρικών φαινομένων) και κυρίως για την θρέψη των προνυμφών το χειμώνα [1,2,4].

Το μέλι είναι μια γλυκιά, εύγευστη, ρευστή ουσία, φυσικά διαθέσιμη με υψηλή θρεπτική αξία [3] και ευρύ φάσμα βιολογικών και θεραπευτικών δράσεων που κεντρίζει ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

1.2 Η σημασία του μελιού στην αρχαιότητα

Η χρήση του μελιού ήταν ευρέως διαδεδομένη σε πολλούς πολιτισμούς από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές και τις θρεπτικές του ιδιότητες [5,6].

Η παλαιότερη απόδειξη αλληλεπίδρασης του ανθρώπου με τις μέλισσες προέρχεται από μία τοιχογραφία που βρέθηκε στην Ισπανία κοντά στο Biscor και χρονολογείται περίπου 8000 χρόνια πριν. Σε αυτήν απεικονίζεται ένας άνθρωπος που συλλέγει μέλι από μια κυψέλη ενώ τον περιτριγυρίζουν μέλισσες [7].



Εικόνα 1.2.1: Τοιχογραφία αλληλεπίδρασης ανθρώπου-μέλισσας. Βρέθηκε στην Ισπανία και χρονολογείται περίπου στο 8000 π.Χ (<https://antiquitynow.org>)

Όμως, η ανάπτυξη της τέχνης της μελισσοκομίας παρατηρείται στην αρχαία Αίγυπτο, στον τύμβο της 26^{ης} Δυναστείας του ευγενή Pabasa. Το συγκεκριμένο ανάγλυφο δείχνει έναν μελισσοκόμο να αντικρίζει ένα σμήνος μελισσών και μια σειρά οριζόντιων κυψελών έχοντας σηκωμένα τα χέρια ψηλά ως ένδειξη ευγνωμοσύνης [7].

Αυτό φανερώνει την αξία του μελιού και των μελισσών για τους αρχαίους Αιγύπτιους την οποία συμμερίζονταν και οι αρχαίοι Έλληνες, με τον Αριστοτέλη να υποστηρίζει την κατανάλωση του μελιού για μακροζωία και τον Ιπποκράτη για θεραπεία πολλών ασθενειών και για καλή υγεία [7,8].



Εικόνα 1.2.2: Η μελισσοκομία στην αρχαία Αίγυπτο. Τύμβος της 26ης Δυναστείας του Pabasa [7].

Επιπλέον, το μέλι συχνά αναμιγνύονταν με βότανα, σιτηρά και άλλα φυτικά προϊόντα και χρησιμοποιούνταν ως φάρμακο για την διέγερση της επούλωσης των τραυμάτων, της αναγέννησης των ιστών, την ανακούφιση γαστρεντερικών διαταραχών και άλλων παθολογιών και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και σήμερα [6,9].

1.3 Σύσταση, χαρακτηριστικά και ιδιότητες του μελιού

I. Σύσταση του μελιού

Το μέλι είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα σακχάρων που περιέχει τουλάχιστον 181 διαφορετικές ουσίες [10]. Οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και γλυκόζη αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος αυτού του διαλύματος καθώς αποτελούν το 75% των συνολικών σακχάρων ενώ οι ολιγοσακχαρίτες το υπόλοιπο 10-15%. Το επόμενο σημαντικότερο συστατικό του μελιού είναι το νερό ενώ σε μικρότερες ποσότητες περιέχει πρωτεΐνες, φαινολικές ενώσεις, μέταλλα και βιταμίνες που συνεισφέρουν σημαντικά στην ποιότητα και τις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού [11,12].

Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του μελιού σε πρωτεΐνες είναι αρκετά χαμηλή και κυμαίνεται ανάμεσα σε 0,1 και 0,5% [10]. Οι πρωτεΐνες συναντώνται στο μέλι κυρίως ως ένζυμα (οξειδάση γλυκόζης, ιμβερτάση, καταλάση, διαστάση ή αμυλάση) και ως ελεύθερα αμινοξέα με πιο σημαντική την προλίνη, η οποία χρησιμοποιείται και ως παράμετρος για την εκτίμηση της ωρίμανσης του μελιού [9,10,12].

Το μέλι περιλαμβάνει οργανικά οξέα σε ποσοστό 0,57% με το γλυκονικό οξύ να είναι το πιο άφθονο, τα οποία συμβάλλουν στην οξύτητα και την χαρακτηριστική γεύση του μελιού [4,12].

Επιπλέον, περιέχει σε μικρές συγκεντρώσεις μέταλλα (0,04-0,2%) με πιο άφθονο το κάλιο και βιταμίνες του συμπλέγματος Β (θειαμίνη Β1, ριβοφλαβίνη Β2, νικοτινικό οξύ Β3, παντοθενικό οξύ Β5, πυριδοξίνη Β6, βιοτίνη Β8, φολικό οξύ Β9) και βιταμίνη C [9,12].

Η σύσταση του μελιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προέλευση της πρώτης ύλης, τη γεωγραφική περιοχή, την εποχή και την επεξεργασία του μετά τη συγκομιδή [12].

II. Χαρακτηριστικά του μελιού

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι πολλές φορές τα φυσικά χαρακτηριστικά του μελιού μας προϋδεάζουν για τη σύσταση του. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το χρώμα του μελιού, το οποίο κυμαίνεται από ανοιχτές έως σκούρες αποχρώσεις του κεχριμπαριού με τις τελευταίες να έχουν συνδεθεί με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και υψηλή αντιβακτηριακή δράση [10]. Το χρώμα του μελιού συνδέεται επίσης με

τη γεύση του, με τα ανοιχτόχρωμα να εμφανίζουν ήπια γεύση και τα σκουρόχρωμα πιο έντονη επηρεάζοντας την προτίμηση του καταναλωτή και την τιμή του προϊόντος [11].

Όμως, τα μέλια εκτός από την ποικιλία σε χρώμα, γεύση και άρωμα, εμφανίζουν και ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη βιολογική δράση τους όπως είναι:

❖ Η χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w): η οποία αντικατοπτρίζει την ποσότητα των ελεύθερων μορίων νερού στο μέλι. Όσο λιγότερα είναι τα ελεύθερα μόρια του νερού τόσο πιο δύσκολη είναι η ανάπτυξη των βακτηρίων. Η ενεργότητα του νερού (a_w) στο μέλι κυμαίνεται από 0,562 έως 0,62 ενώ τα περισσότερα βακτήρια απαιτούν a_w 0,94-0,99 για να αναπτυχθούν [10]. Επίσης, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα οδηγεί στο φαινόμενο της ώσμωσης κατά το οποίο η ωσμωτική πίεση που ασκεί η υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων στα βακτηριακά κύτταρα προκαλεί τη μεταφορά του νερού έξω από αυτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα βακτηριακά κύτταρα να αφυδατώνονται και να αδυνατούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν [10,13].

❖ Το χαμηλό pH: το οποίο οφείλεται στην παρουσία διάφορων οργανικών οξέων με πιο άφθονο το γλυκονικό οξύ που προκύπτει από την αντίδραση της γλυκόζης με νερό μέσω της δράσης του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης [13]. Η τιμή του pH του μελιού κυμαίνεται ανάμεσα σε 3,2 και 4,5 και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην αντιβακτηριακή του δράση [10]. Παρόλα αυτά, το χαμηλό pH του μελιού συμβάλλει στην αντιβακτηριακή δράση του κυρίως όταν το μέλι δεν είναι αραιωμένο, ενώ δεν αρκεί από μόνο του για την αναστολή βακτηρίων όταν το μέλι διαλύεται σε μια τροφή ή στα υγρά του σώματος [10].

Κάθε μέλι που προέρχεται από διαφορετική πηγή εμφανίζει μοναδική σύσταση, άρωμα, χρώμα, γεύση και επίπεδο αντιμικροβιακής δράσης [13].

III. Ιδιότητες του μελιού

Αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση

Το μέλι χρησιμοποιούνταν ήδη από την αρχαιότητα για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων και για το κρυολόγημα, φανερώνοντας την αντιμικροβιακή του δυναμική έναντι μολυσματικών ασθενειών [14]. Η εμφάνιση όμως μικροοργανισμών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά είναι αυτή που επανέφερε το μέλι στο επίκεντρο των ερευνών

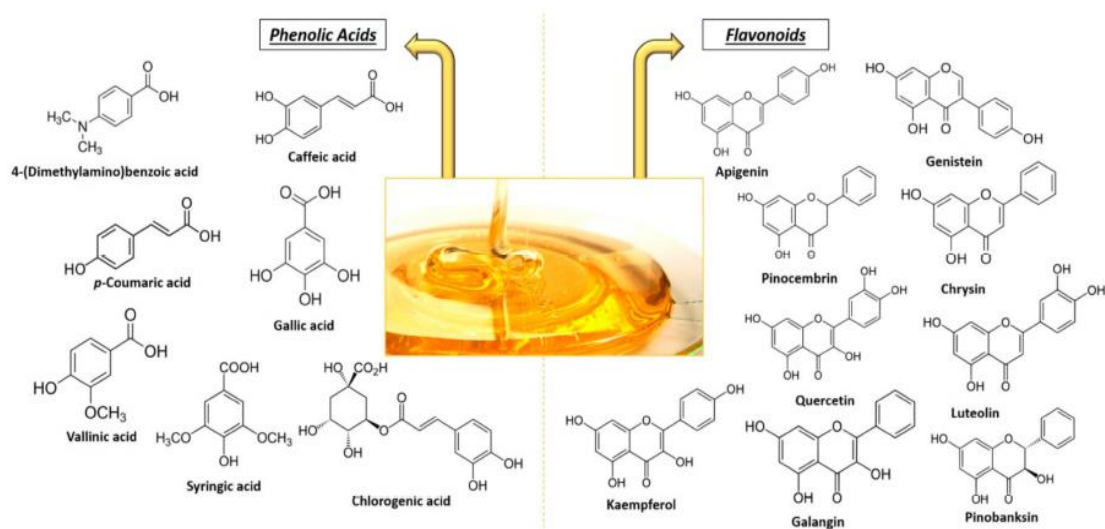
[15]. Το μέλι εμφανίζει ευρύ φάσμα δράσης έναντι παθογόνων Gram(+) και Gram(-) βακτηρίων και μυκήτων όπως είναι ο *Staphylococcus aureus*, το *Helicobacter pylori* και η *Candida albicans*, ενώ μέχρι στιγμής κανένας μικροοργανισμός δεν έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στο μέλι [15]. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είχε αποδοθεί αρχικά στην χαμηλή ενεργότητα του νερού, την υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και στο χαμηλό pH του [14,17]. Πρόσφατες έρευνες όμως, έχουν προσδιορίσει συστατικά του μελιού που φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμικροβιακή του δράση και είναι:

❖ Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2): είναι ένα δευτερεύον προϊόν που προκύπτει από την οξείδωση της γλυκόζης μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης το οποίο εμφανίζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση [15]. Η οξειδάση της γλυκόζης όμως είναι ανενεργή σε μη αραιωμένο μέλι [13]. Η αντιμικροβιακή δράση του H_2O_2 αυξάνεται με την αραιώση του μελιού κατά την οποία η οξειδάση της γλυκόζης συνδέεται πιο σταθερά με τη γλυκόζη με αποτέλεσμα την συνεχή παραγωγή H_2O_2 [15]. Χάρη σε αυτή την ιδιότητα το μέλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην φροντίδα πληγών καθώς οι εκκρίσεις από την πληγή το αραιώνουν, ενισχύοντας την αντιβακτηριακή του δράση [13]. Το H_2O_2 εμφανίζει επίσης οξειδωτική δράση, η οποία προκαλεί την αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης και μη αναστρέψιμη βλάβη του μικροβιακού DNA μέσω της δημιουργίας ριζών OH [15]. Τα επίπεδα H_2O_2 ποικίλουν ανάμεσα στα μέλια και εξαρτώνται στενά από την συγκέντρωση της καταλάσης, ένα ένζυμο που διασπά το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη καταλάσης στο μέλι δεν αναιρεί πλήρως την αντιβακτηριακή του δράση υποδεικνύοντας την ύπαρξη και άλλων παραγόντων που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δράση του H_2O_2 [10].

❖ Μεθυλγλυοξάλη (MGO: $CH_3-CO-CH=O$ ή $C_3H_4O_2$): είναι μία 1,2-δικαρβονυλική ένωση που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης Maillard ή των αντιδράσεων καραμελοποίησης ως προϊόν αποδόμησης από την αναγωγή υδατανθράκων [10,16]. Η MGO συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μέλι Manuka και σχηματίζεται από την πρόδρομη ένωση διυδροξυακετόνη, μέσω μίας μη ενζυμικής διαδικασίας που συμβαίνει κατά την αποθήκευση του μελιού [17]. Έχει αναγνωριστεί ως το κύριο αντιμικροβιακό συστατικό του μελιού Manuka και μπορεί να μεταβάλλει τη δομή των βακτηριακών κροσσών και μαστιγίων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες, συρρίκνωση και στρογγυλοποίηση των βακτηριακών κυττάρων [15].

❖ Αμυντοσίνη-1 (beedefensin-1): είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτιδίο (AMP) το οποίο εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένα της μέλισσας και μεταφέρεται στο μέλι [17]. Συμμετέχει στην άμεση ανοσολογική απόκριση της μέλισσας εμφανίζοντας δράση έναντι μυκήτων, ζυμομυκήτων, πρωτόζωων, Gram(-) και Gram(+) βακτηρίων όπως είναι ο *Bacillus subtilis* [15]. Η αμυντοσίνη-1 μαζί με το H₂O₂ θεωρούνταν ως οι κύριοι αντιμικροβιακοί παράγοντες στο μέλι Revamil [13]. Αν και ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται να μπορεί να δημιουργεί έναν πόρο στην βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας κυτταρικό θάνατο [15]. Η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων από τους αδένες μεμονωμένων μελισσών ποικίλλει με αποτέλεσμα και τα επίπεδα της αμυντοσίνης να διαφέρουν ανάμεσα στα διάφορα δείγματα μελιών [15].

❖ Φαινολικές ενώσεις: είναι μια ετερογενής ομάδα χημικών ενώσεων που μπορεί να χωριστεί στα φλαβονοειδή και στα φαινολικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και έχουν αναγνωριστεί για τη συμβολή τους στις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού [9,15]. Εμφανίζουν σημαντική αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση με τη δέσμευση ελεύθερων ριζών και τη μετατροπή τους σε πιο σταθερά και λιγότερο τοξικά μόρια [9]. Αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της μη υπεροξειδικής αντιβακτηριακής δράσης του μελιού και δεν είναι ευαίσθητες στη θερμότητα και στην κατεργασία με καταλάση, σε αντίθεση με το H₂O₂ [13]. Οι φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιούνται επίσης, για την αναγνώριση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης ενός δείγματος μελιού [15].



Εικόνα 1.3.1: Τα πιο συνήθη φαινολικά συστατικά του μελιού [9]

Αντιφλεγμονώδης και επουλωτική δράση

Το μέλι έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση σε κυτταροκαλλιέργειες, πειραματόζωα και κλινικές δοκιμές. Η ιδιότητα του αυτή έχει αποδοθεί κυρίως στη φαινολική σύσταση του [18]. Η αντιφλεγμονώδης δράση του μειώνει το οίδημα και τις εκκρίσεις της πληγής βελτιώνοντας άμεσα τη διαδικασία της επούλωσης. Συγχρόνως, η επίδραση αυτή καταπραΰνει τον πόνο που προκαλείται από πίεση στις νευρικές απολήξεις και μειώνει την ποσότητα της προσταγλανδίνης που παράγεται κατά τη φλεγμονή [19]. Το μέλι επίσης, διεγείρει την αγγειογένεση και την επιθηλιοποίηση επιταχύνοντας τη διαδικασία της επούλωσης με αποτέλεσμα να προτείνεται η χρήση του στη θεραπεία ήπιων έως μέτριων επιφανειακών εγκαυμάτων. Παρόλα αυτά χρειάζεται να γίνουν περισσότερες μελέτες για την υποστήριξη αυτού του πορίσματος [18,19].

Καρδιαγγειακές και μεταβολικές διαταραχές

Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την κατανάλωση του μελιού με τη μείωση των παραγόντων κινδύνου μεταβολικών και καρδιαγγειακών διαταραχών σε ασθενείς αλλά και σε άτομα που εμφανίζουν προδιάθεση. Προηγούμενες έρευνες έχουν καταγράψει τη μείωση των επιπέδων των παραγόντων κινδύνου στο πλάσμα όπως είναι της ολικής χοληστερόλης, της LDL-χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης σε υγιείς και διαβητικούς, της C-δραστικής πρωτεΐνης, αλλά και την αύξηση της HDL-χοληστερόλης στο αίμα [20]. Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν καρδιοπροστατευτική επίδραση μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως είναι i) η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων, ii) η πρόληψη της οξειδωσης των LDLs και iii) η βελτίωση της αγγειοδιαστολής των στεφανιαίων αρτηριών. Τέλος, το μέλι αναστέλλει την πήξη του αίματος και θεωρείται ιδανικό για την αντιμετώπιση του σχηματισμού αθηροσκληρωτικών πλακών που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρδιακών διαταραχών [9].

Αντικαρκινική δράση

Το μέλι εμφανίζει αντικαρκινική δράση σε διάφορα στάδια του καρκίνου, κατά την έναρξη, τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη [9]. Σύμφωνα με έρευνες η αντικαρκινική

ιδιότητα του μελιού οφείλεται στη παρεμβολή του σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την επαγωγή της απόπτωσης, αντιμεταλλαξογόνων, αντιμιτωτικών, αντιφλεγμονώδων και ανοσορυθμιστικών μονοπατιών [18,21]. Μελέτες υποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά συστατικά του μελιού διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο στο γλοίωμα, το μελάνωμα και σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου στη φάση G0/G1 [21]. Είναι αναγκαίο όμως να γίνουν περισσότερες μελέτες για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης του μελιού και της θετικής επίδρασης τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου [18,21].

Γαστρεντερικές διαταραχές

Το μέλι έχει προταθεί ως δυνητικά χρήσιμο για διάφορες διαταραχές της γαστρεντερικής οδού όπως είναι η δυσπεψία και τα έλκη. Μελέτες *in vitro* προτείνουν ότι το μέλι ασκεί βακτηριοκτόνο δράση έναντι του *Helicobacter pylori* που αποτελεί την πιο κοινή αιτία στομαχικών ελκών [13]. Εκτός από την αντιβακτηριακή του δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, το μέλι επωφελεί την ανάπτυξη της ωφέλιμης μικροβιακής χλωρίδας της γαστρεντερικής οδού [13]. Τα πρεβιοτικά που περιέχει βελτιώνουν την ανάπτυξη και την βιολογική δράση των βακτηρίων *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* τα οποία συμβάλλουν στην ισορροπία της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος [22]. Επίσης, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το μέλι συμβάλλει στη θεραπεία της βρεφικής γαστρεντερίτιδας με μείωση της διάρκειας της διάρροιας και βοηθώντας στην αποκατάσταση της ενυδάτωσης μετά τη γαστρεντερίτιδα [9,18].

Αντιϊκή δράση

Μέχρι στιγμής, η αντιϊκή δράση του μελιού έχει μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις υπόλοιπες ιδιότητες του [12]. Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει την αναστολή διαφόρων ιικών στελεχών με την παρουσία φλαβονοειδών, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), ασκορβικού οξέος και νιτρικού οξειδίου (NO) στο μέλι, σηματοδοτώντας την περαιτέρω διερεύνηση του στην αντιμετώπιση ιικών λοιμώξεων. Ήδη, αρκετές μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει την αντιϊκή δράση του μελιού έναντι του ιού της Ερυθράς, του Coxsackie B, του απλού έρπη και του έρπητα ζωστήρα [12,21]. Σημαντική συμβολή σε αυτή την δράση φαίνεται να έχει το NO, μέσω παρεμπόδισης της λειτουργίας της ιϊκής πολυμεράσης, και τα φλαβονοειδή μέσω αναστολής της μεταγραφής και αντιγραφής των ιών

[21]. Επίσης, αξιολογημένη είναι η ευεργετική δράση του μελιού στην επούλωση του επιχέλιου έρπητα με τοπική επάλειψη, εμφανίζοντας καλύτερα αποτελέσματα από τη συμβατική θεραπεία [6]. Το μέλι Manuka αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μελιού με σημαντική αντιϊκή δράση, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα του έναντι του ιού της γρίπης σε κυτταρική σειρά νεφρών σκύλου (MDCK). Η συνεργική δράση του με τα αντιϊκά φάρμακα zanamivir και oseltamivir στη μείωση των ιϊκών πλακών του ιού της γρίπης, δίνει το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση της αντιϊκής δράσης των μελιών αλλά και του συνδυασμού της με τη χρήση γνωστών αντιϊκών φαρμάκων [14].

1.4 Κατηγοριοποίηση - είδη μελιών

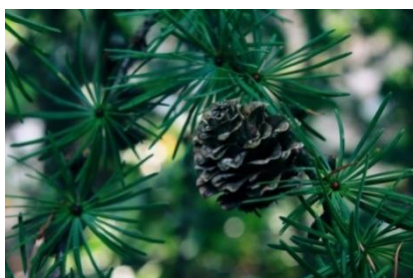
Ανάλογα με την προέλευση το μέλι μπορεί να ταξινομηθεί σε διαφορετικές κατηγορίες οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

- 1) Μέλι ανθέων (blossom honey): το οποίο παράγεται κυρίως από το νέκταρ των ανθέων
- 2) Μέλι μελιτώματος (honeydew): το οποίο παράγεται από τη συλλογή εκκρίσεων ζωντανών φυτών, αφίδων και εντόμων

Το ανθόμελο μπορεί να χωριστεί περαιτέρω σε μονοανθικό, όπου η βοτανική προέλευση είναι κατά κύριο λόγο από ένα είδος λουλουδιού ή πολυανθικό, όπου μπορούν να εντοπιστούν πολλαπλές πηγές ειδών λουλουδιών [15,16].

Σε αντίθεση με το ανθόμελο, το μέλι μελιτώματος έχει πιο σκούρο χρώμα και εμφανίζει υψηλότερες τιμές pH, υψηλότερα επίπεδα δισακχαριτών, τρισακχαριτών και χαμηλότερα επίπεδα μονοσακχαριτών. Επίσης, το μέλι μελιτώματος εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα σε σχέση με τα ανθόμελα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μέλι μελιτώματος να παρουσιάζει υψηλότερη αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Μέχρι στιγμής όμως υπάρχουν λίγες μελέτες που να επικεντρώνονται στις ευεργετικές δράσεις του στην ανθρώπινη υγεία [11].

Μέλι Πεύκου



Το μέλι πεύκου προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* γνωστό και ως «εργάτης» του πεύκου. Αποτελεί το πιο σημαντικό μελισσοκομικό φυτό της Ελλάδας και συλλέγεται από τον Απρίλιο μέχρι τον Νοέμβριο. Το χρώμα του πευκόμελου είναι χαρακτηριστικό και κυμαίνεται από ανοιχτόχρωμο όταν συλλέγεται κατά την περίοδο της άνοιξης, έως σκουρόχρωμο κατά την περίοδο του φθινοπώρου. Εμφανίζει υψηλή θρεπτική αξία η οποία οφείλεται στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που συνυπάρχουν στη σύσταση του και στην πλούσια περιεκτικότητά του σε ιχνοστοιχεία. Η κρυστάλλωση του γίνεται με αρκετά βραδύ ρυθμό λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του σε γλυκόζη [23].

Μέλι Ελάτης

Προέρχεται από τις εκκρίσεις κοκκοειδών και αφίδων που παρασιτούν στα έλατα και αποτελεί το 5-10% της ετήσιας συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Εμφανίζει ιδιαίτερα καλή γεύση και χαρακτηριστική εμφάνιση η οποία ποικίλει ανάλογα με την περιοχή προέλευσης του. Είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο και λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη δεν κρυσταλλώνει. Το pH του είναι υψηλότερο από όλες τις άλλες κατηγορίες μελιού, ιδιαίτερα από τα ανθόμελα, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται με βραδύτερο ρυθμό συγκριτικά με αυτά [23].



Μέλι Καστανιάς

Θεωρείται ανθόμελο με χαρακτηριστικά μελιτώματος καθώς παράγεται τόσο από το νέκταρ της καστανιάς (*Castanea sativa*) όσο και από τις μελιτώδεις εκκρίσεις της αφίδας *Myzocallis castanicola* που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων της καστανιάς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις αρχίζουν τον Μάιο και συνεχίζονται μέχρι τον Ιούλιο ή λίγο αργότερα. Το χρώμα του ποικίλει ανάλογα με την προέλευση του από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο αν πρόκειται για μελίτωμα. Έχει έντονο άρωμα και γεύση που σε μικρή αναλογία μπορεί να υπερκαλύψει τη γεύση άλλων μελιών. Επίσης, έχει βρεθεί ότι επιταχύνει την κυκλοφορία του αίματος και δρα ως στυπτικό σε μερικές περιπτώσεις δυσεντερίας [23].



Μέλι Ερείκης

Στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών, η φθινοπωρινή ερείκη (*Erica verticillata*), η ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδεντρο (*Rhododendron*). Από την



νεκταροέκκριση αυτών των φυτών προκύπτουν οι αντίστοιχοι τύποι μελιών οι οποίοι φέρουν διαφορετικές ιδιότητες. Το μέλι της φθινοπωρινής ερείκης παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στην Ελλάδα και είναι ευρέως διαθέσιμο στα καταστήματα υγιεινής διατροφής λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Το χρώμα του είναι κοκκινωπό και εμφανίζει χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-3 μήνες). Το μέλι της ανοιξιιάτικης ερείκης είναι ανοιχτόχρωμο και έχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης [23].

Θυμαρίσιο μέλι

Θεωρείται άριστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού αρώματος και της γεύσης του και αποτελεί το 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Έχει ευχάριστη γεύση αλλά ορισμένες φορές, λόγω υψηλής συγκέντρωσης σε φρουκτόζη



αφήνει μια αίσθηση καψίματος. Αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας και έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες. Έρευνες έχουν δείξει ότι συμβάλλει στην προστασία από τον καρκίνο του προστάτη και του μαστού. Εμφανίζει χαρακτηριστικό ανοιχτό χρώμα και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6 με 18 μηνών [23].

Μέλι Κουμαριάς

Συλλέγεται από το νέκταρ της ανοιξιιάτικης κουμαριάς (*Arbutus unedo*) και είναι τονωτικό για τα μελίσσια. Εμφανίζει σκουροχάλκινο χρώμα και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία, πρωτεΐνες, αμινοξέα και βιταμίνες. Η εμπορική του αξία είναι περιορισμένη λόγω της υπόπικρης γεύσης του.



Οι μελισσοκόμοι συνήθως δεν το τρύγουν αλλά το αφήνουν για το ξεχειμώνιασμα των μελισσών [23].

Μέλι Βαμβακιού

Προέρχεται από το νέκταρ των ανθικών και εξωανθικών νεκτάρων του φυτού και από το μελίτωμα που εκκρίνεται από διάφορα έντομα τα οποία παρασιτούν την καλλιέργεια. Το μέλι βαμβακιού από μελίτωμα είναι ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται σχεδόν άχρωμο, ενώ το μέλι βαμβακιού από άνθος είναι ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται γαλακτόχρωμο. Έχει την υψηλότερη βακτηριοκτόνο δράση από όλα τα άλλα μέλια λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης σε H₂O₂ [23].



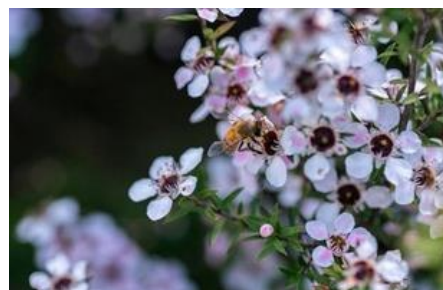
Μέλι Ηλιάνθου

Συναντάται σε σημαντικές καλλιεργούμενες εκτάσεις στην Ελλάδα. Ανθίζει Ιούνιο με Ιούλιο και το μέλι του είναι ανοιχτόχρωμο κι έχει βουτυρώδη γεύση. Λόγω του υψηλού ποσοστού υγρασίας ξινίζει εύκολα και οι υψηλές συγκεντρώσεις του σε γλυκόζη οδηγούν σε γρήγορη κρυστάλλωση του. Έχει σημαντική θρεπτική αξία χάριν στη πλούσια σύσταση του σε πολυφαινόλες [23].



1.5 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka είναι ένα σκουρόχρωμο μονοανθικό μέλι με σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον χάρη στις μοναδικές του βιολογικές δράσεις. Το μέλι αυτό προέρχεται από το νέκταρ του φυτού Manuka, *Leptospermum scoparium*, της οικογένειας *Myrtaceae*, το οποίο αναπτύσσεται ως θάμνος ή μικρό δέντρο σε όλη την Νέα Ζηλανδία και την ανατολική Αυστραλία [16]. Σε αντίθεση με πολλά μέλια η παραγωγή H₂O₂ στο μέλι Manuka είναι χαμηλή και μπορεί να εξουδετερωθεί από την



καταλάση, ενώ αυτό συνεχίζει να διατηρεί τη δράση του [24]. Υπεύθυνη γι' αυτή την μη υπεροξειδική δράση είναι η δραστική ένωση μεθυλγλυοξάλη (MGO) που συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μέλι Manuka και έχει καθοριστικό ρόλο στην αντιμικροβιακή του δράση [14,24]. Η MGO προέρχεται από την αυθόρμητη αφυδάτωση της πρόδρομης ένωσης διυδροξυακετόνης (DHA), μίας φυτοχημικής ουσίας που συναντάται φυσικά στο νέκταρ των ανθέων του *Leptospermum scoparium* [24]. Η μη υπεροξειδική αντιβακτηριακή δράση που οφείλεται στην παρουσία της MGO ονομάζεται μοναδικός παράγοντας Manuka (UMF) και η τιμή του αυξάνεται ανάλογα με τη σύσταση του μελιού σε MGO [16]. Το μέλι Manuka εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων που περιλαμβάνει τον *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* και τον *Staphylococcus aureus* [16].

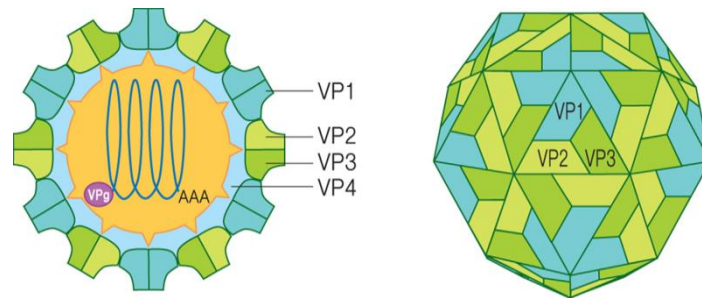
Η MGO όμως, αντιπροσωπεύει μόνο τη μισή αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka καθώς υπάρχει μια απροσδιόριστη συνέργια μεταξύ της MGO και άλλων μη υπεροξειδικών παραγόντων που προέρχονται από το φυτό Manuka [13]. Σε αυτές τις ενώσεις ανήκει η λεπτοσίνη, ένα γλυκοσίδιο του μεθυλικού συριγγικού οξέος που βρίσκεται αποκλειστικά στο μέλι *Leptospermum* και συνδέεται με τη ρύθμιση της αντιμικροβιακής του δράσης, και οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στις αντιφλεγμονώδεις και επουλωτικές ιδιότητες του [24].

Ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων ενδέχεται να είναι υπεύθυνος για την ανικανότητα των βακτηρίων να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στο μέλι, σε αντίθεση με την ταχεία επαγωγή ανθεκτικότητας που παρατηρείται στη χρήση συμβατικών αντιβιοτικών ενός συστατικού [16].

1.6 Εντεροϊός D68

Ο ανθρώπινος Εντεροϊός D68 (EV-D68) είναι μέλος του είδους Εντεροϊών D (EV-D) το οποίο ανήκει στο γένος *Enterovirus* της οικογένειας *Picornaviridae* [25]. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από ιούς μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας και μικρού μεγέθους όπως υποδηλώνει και το όνομα της (pico= μικρό) [26]. Το γονιδίωμα των εντεροϊών όπως και των υπόλοιπων *Picornaviridae* ιών, έχει μέγεθος περίπου 7,5kb και εγκλείεται μέσα σε ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας απουσία λιπιδικού φακέλου [27,28]. Η ομάδα των εντεροϊών περιλαμβάνει τους πιο κοινούς παθογόνους ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο

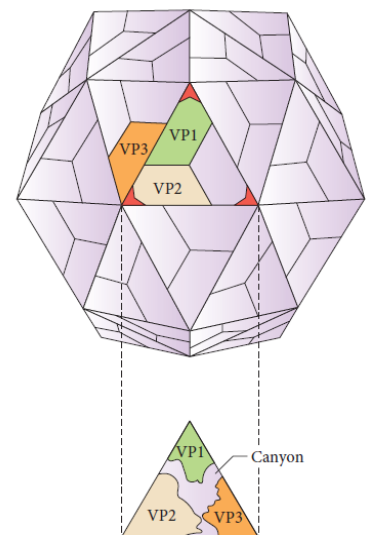
και είναι υπεύθυνη για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ήπιες έως και σοβαρές διαταραχές [28,29].



Εικόνα 1.6.1 Δομή ενός ιού Picorna [31]

Δομή ιϊκού σωματιδίου

Το ιϊκό σωματίδιο των εντεροϊών αποτελεί ένα μη επενδεδυμένο νουκλεοκαψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας με διάμετρο περίπου 30nm. Συγκροτείται από 60 δομικές υπομονάδες, τα πρωτομερή, που αποτελούνται από τις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 [30]. Κάθε πρωτομερές συνίσταται από ένα αντίγραφο των πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου ενώ η VP4 εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια με αποτέλεσμα να σχηματίζουν μια τριγωνική υπομονάδα στην επιφάνεια του καψιδίου [26]. Η ένωση 5 πρωτομερών οδηγεί στο σχηματισμό ενός πενταμερούς που συμβάλλει στη δημιουργία της εικοσαεδρικής δομής η οποία αποτελείται συνολικά από 12 πενταμερή [32].



Εικόνα 1.6.2 Απεικόνιση του canyon [26]

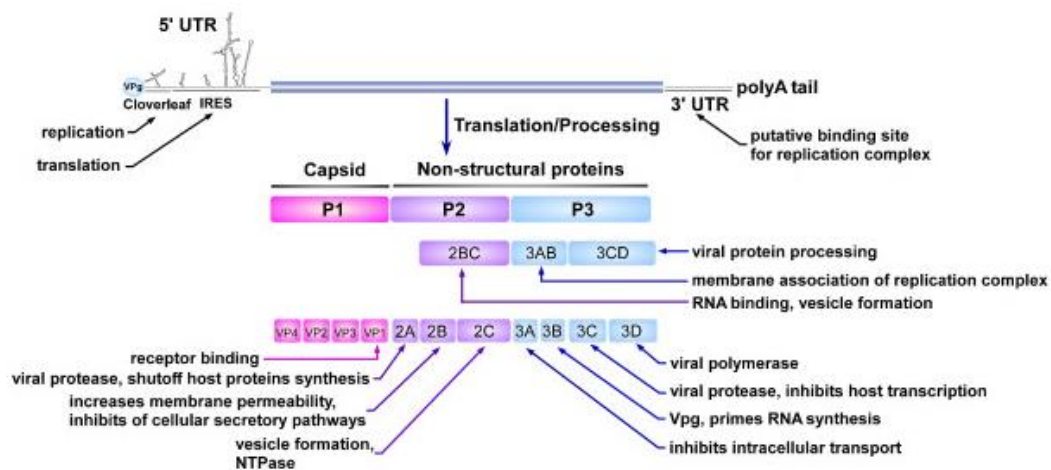
Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 έχουν σφηνοειδή δομή και παρουσιάζουν μια προεξοχή στο ένα άκρο τους. Οι προεξοχές των VP1 πρωτεϊνών σχηματίζουν πενταμερείς άξονες συμμετρίας ενώ οι προεξοχές των VP2 και VP3 σχηματίζουν τριμερείς άξονες συμμετρίας.

Ο προσανατολισμός των καψιδιακών πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα οι επιφάνειες των πρωτεϊνών VP1 να διαχωρίζονται από τις επιφάνειες των VP2 και VP3 από μία αυλάκωση που διατρέχει κάθε πενταμερή άξονα και είναι γνωστή ως “canyon” [26]. Η περιοχή του canyon συνδέεται με υποδοχείς της υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών

διεγείροντας την απέκδυση του ιού κατά την είσοδο του στο κύτταρο [27]. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς, το canyon του EV-D68 είναι πιο μικρό και στενό κι ενδεχομένως να μην χρησιμοποιεί τους υποδοχείς αυτής της οικογένειας [33].

Οργάνωση του ιϊκού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του EV-D68 είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους περίπου 7,5kb [27,34]. Αποτελείται από μία πρωτεΐνη VPg συνδεδεμένη στο 5' άκρο του, μία 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR), ένα απλό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη, μία 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) και μία πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly-A) στο 3' άκρο του [33]. Η VPg πρωτεΐνη είναι σημαντική για τη σύνθεση του ιϊκού RNA καθώς οι Picorna ιοί δεν διαθέτουν μεθυλιωμένη καλύπτρα, αλλά χάνεται γρήγορα μέσα στο κύτταρο με αποτέλεσμα τα περισσότερα ιϊκά μετάγραφα να μη την έχουν [27,32]. Η πολυπρωτεΐνη αρχικά κόβεται σε τρία μέρη: P1, P2 και P3 από τις πρωτεάσες 2A και 3C. Η P1 κόβεται στη συνέχεια σε 4 καψιδιακές πρωτεΐνες τις VP1-VP4 και οι P2 και P3 κόβονται σε 7 μη δομικές πρωτεΐνες τις 2A-2C και 3A-3D οι οποίες συμβάλλουν στην επεξεργασία και την αντιγραφή του γονιδιώματος [34].



Εικόνα 1.6.3 Το γονιδίωμα του εντεροϊού, η πολυπρωτεΐνη του και οι ιδιότητες των προϊόντων της [27].

- **5'UTR:** αποτελεί το 10% περίπου του ολικού RNA γονιδιώματος σε μήκος και είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένη ανάμεσα στα είδη των Picorna ιών. Περιέχει δομές σημαντικές για την ιϊκή αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα όπως είναι το

IRES και το cloverleaf. Η εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES) στρατολογεί το σύμπλεγμα μετάφρασης του ξενιστή επάγοντας την μετάφραση του ιϊκού γονιδιώματος, ενώ το cloverleaf είναι μία cis-δραστική δομή που επάγει τη σύνθεση του αρνητικού και θετικού κλώνου [35,36].

- **Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF):** βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές 5'UTR και 3'UTR και διακρίνεται σε 3 περιοχές, την P1 που κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες και τις P2 και P3 που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επεξεργασία και την αντιγραφή του γονιδιώματος [34,36]. Το VP1 γονίδιο που εμπεριέχεται στην περιοχή που κωδικοποιεί την P1 εμφανίζει μεγάλη ποικιλία στο γονιδίωμα των εντεροϊών και χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των ιών σε διαφορετικούς ορότυπους και γονότυπους [25].
- **3'UTR:** είναι πιο μικρή περιοχή σε σχέση με την 5'UTR, το μήκος της κυμαίνεται ανάμεσα σε 100-300nt και συμβάλλει στην αντιγραφή του ιού και στην παθογένεια του. Συνοδεύεται από μια πολυαδενυλιωμένη ουρά που συμμετέχει στο σχηματισμό σταθερών RNA δευτεροταγών δομών με την 3'UTR και προστατεύει το ιϊκό RNA γονιδίωμα από την αποικοδομητική δράση ενδοκυτταρικών ενζύμων [35,36].

Ταξινόμηση των εντεροϊών

Ο διαχωρισμός των ιών σε οικογένειες βασίζεται στην μορφολογία του ιοσωματίου, στην δομή και οργάνωση του γονιδιώματος και στις στρατηγικές που ακολουθεί ο ιός για την αντιγραφή του γονιδιώματος του. Τα γένη που υπάρχουν σε κάθε οικογένεια διακρίνονται με βάση τις βιολογικές, γενομικές, φυσικοχημικές και ορολογικές διαφορές τους [37].

Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των ιών η οικογένεια των Picorna ιών αποτελείται από 47 γένη (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV).

Πίνακας 1.6.1: Τα 47 γένη της οικογένειας *Picornaviridae* (ICTV)

Aalivirus	Ailurivirus	Ampivirus	Anativirus	Aphthovirus	Aquamavirus	Avihepatovirus
Avisivirus	Bopivirus	Cardiovirus	Cosavirus	Crohivirus	Dicipivirus	Enterovirus
Erbovirus	Gallivirus	Harkavirus	Hepatovirus	Hunnivirus	Kobuvirus	Kunsagivirus
Limnipivirus	Livupivirus	Malagasivirus	Megrivirus	Mischivirus	Mosavirus	Orivirus

Oscivirus	Parechovirus	Pasivirus	Passerivirus	Poecivirus	Potamipivirus	Rabovirus
Rafivirus	Rosavirus	Sakobuvirus	Salivirus	Sapelovirus	Senecavirus	Shanbavirus
Sicinivirus	Teschovirus	Torchivirus	Tottorivirus	Tremovirus		

Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει τους πιο συχνούς μολυσματικούς παράγοντες που προσβάλλουν τον άνθρωπο και χωρίζεται σε 15 είδη με πολλαπλούς ορότυπους το καθένα [38, ICTV].

Πίνακας 1.6.2: Τα είδη των εντεροϊών και οι ορότυποι τους (ICTV)

<u>Είδος</u>	<u>Αριθμός ορότυπων</u>
Enterovirus A	25
Enterovirus B	63
Enterovirus C	23
Enterovirus D	5
Enterovirus E	5
Enterovirus F	7
Enterovirus G	22
Enterovirus H	1
Enterovirus I	1
Enterovirus J	6
Enterovirus K	2
Enterovirus L	1
Rhinovirus A	80
Rhinovirus B	32
Rhinovirus C	57

Οι εντεροϊοί και οι ρινοϊοί διαχωρίζονται τυπικά με βάση την θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται καλύτερα και την ευαισθησία τους στην οξύτητα. Οι ρινοϊοί αναπτύσσονται καλύτερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και μπορούν να αντιγράφονται στη

ρινική κοιλότητα, ενώ οι εντεροϊοί είναι πιο ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον το οποίο τους επιτρέπει να αναπτύσσονται στο στομάχι [39].

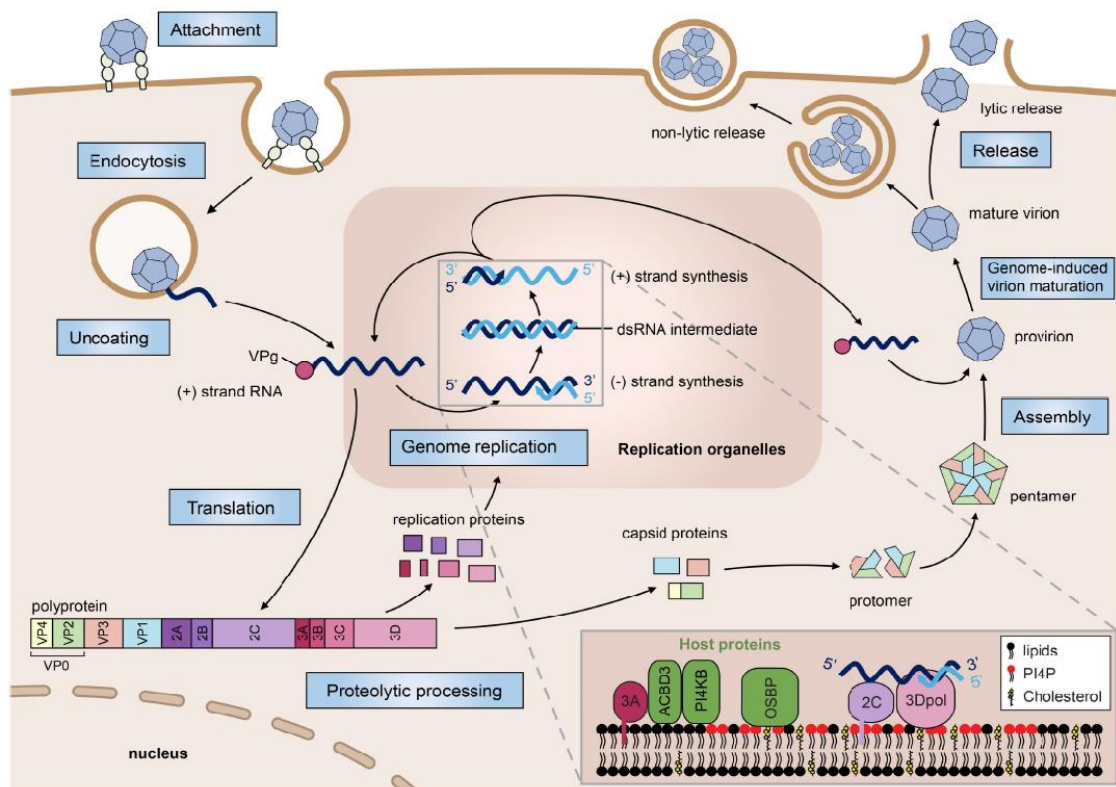
Ο EV-D68 όμως μοιράζεται χαρακτηριστικά και των εντεροϊών και των ρινοϊών και είχε αρχικά ταξινομηθεί ως ρινοϊός 87. Σε αντίθεση με τους άλλους εντεροϊούς, ο EV-D68 αντιγράφεται καλύτερα στους 33°C στην ρινική κοιλότητα και είναι ευαίσθητος σε όξινο περιβάλλον με αποτέλεσμα να μην επιβιώνει στο στομάχι. Αν και συνδέεται γενετικά περισσότερο με τους εντεροϊούς απ' ότι με τους ρινοϊούς μελέτες των κυτταρικών υποδοχέων του έχουν δείξει ότι στοχεύει στα α2-6 συνδεδεμένα σιαλικά οξέα τα οποία συναντώνται στην επιφάνεια των κυττάρων της ανώτερης αναπνευστικής οδού [40]. Παρόλα αυτά, ο EV-D68 είναι ικανός να αντιγράφεται σε κύτταρα ιστών διαφορετικής προέλευσης που είναι ευάλωτα σε εντεροϊούς και ρινοϊούς (κυτταρικές σειρές RD, MRC5, RMK, HFKD) [34].

1.7 Κύκλος ζωής του ιού

Οι εντεροϊοί εκμεταλλεύονται τους κυτταρικούς μηχανισμούς του ξενιστή για να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους. Η σύνδεση των ιϊκών σωματίων τους στον κατάλληλο υποδοχέα είναι σημαντική για την πρόσδεση, την εσωτερίκευση και την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ενώ καθορίζει επίσης τον κυτταρικό τύπο και ιστό που προσβάλλει [41].

Μελέτες της κρυσταλλικής δομής του EV-D68 δείχνουν ότι συνδέεται μέσω του canyon σε α2-6 συνδεδεμένα σιαλικά οξέα κυρίως, τα οποία συναντώνται στα επιθηλιακά κύτταρα της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Η σύνδεση αυτή προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του ιού επάγοντας την είσοδο του μέσω ενδοκύττωσης [28,42]. Μετά την είσοδο του ιϊκού σωματίου στον ξενιστή ακολουθεί η απέκδυση του, επιτρέποντας την απελευθέρωση του RNA γονιδιώματος στο κυτόπλασμα [29]. Επειδή το γονιδίωμα είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας λειτουργεί ως mRNA το οποίο μεταφράζεται από τα κυτταρικά ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή [29,43]. Η πολυπρωτεΐνη που παράγεται τεμαχίζεται από τις ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro} σε 10 πρωτεΐνες, τις καψιδιακές VP0, VP3 και VP1 και τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή 2A-C και 3A-D. Η αντιγραφή του γονιδιώματος λαμβάνει χώρα στα οργανίδια αντιγραφής ROS που σχηματίζονται από τις κυτταρικές μεμβράνες κατά την ιϊκή μόλυνση [29,44]. Η αντιγραφή ξεκινάει με την δημιουργία ενός συμπληρωματικού κλώνου του γονιδιώματος (αρνητικής πολικότητας) από την ιϊκή RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, οδηγώντας στη σύνθεση ενός δίκλωνου RNA. Το δίκλωνο RNA λειτουργεί ως μήτρα για τη σύνθεση νέων

κλώνων θετικής πολικότητας πανομοιότυπων του γονιδιώματος, τα οποία είτε εισέρχονται σε έναν νέο κύκλο μετάφρασης/αντιγραφής είτε εισέρχονται σε καψίδια για να παράγουν ιϊκά σωματίδια [29,32,44]. Η συναρμολόγηση των νέων ιϊκών σωματίων περιλαμβάνει αρχικά τη δημιουργία ενός προκαψιδίου που αποτελείται από αντίγραφα των πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3. Στη συνέχεια, το ιϊκό RNA επάγει τον τεμαχισμό της VP0 σε VP2 και VP4 συνθέτοντας ένα ώριμο πλέον ιϊκό σωματίο το οποίο απελευθερώνεται μέσω λύσης του κυττάρου-ξενιστή [29,44].



Εικόνα 1.7.1: Κύκλος ζωής των εντεροϊών [44]

1.8 Παθογένεια του ιού

Ο EV-D68 είναι υπεύθυνος για ήπιες έως και σοβαρές ασθένειες της αναπνευστικής οδού. Μεταδίδεται μέσω εισπνοής σωματιδίων (αεροζόλ) ή έκθεσης της ανώτερης αναπνευστικής οδού με μολυσμένο υλικό από επιφάνειες του περιβάλλοντος [45,46]. Με την είσοδο του στην ανώτερη αναπνευστική οδό συνδέεται στα επιθηλιακά κύτταρα της βλεννογόνου επιφάνειας και εξαπλώνεται στην αρχή τοπικά και στη συνέχεια μεταφέρεται σε δευτερεύοντα όργανα-στόχους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (αιμία) [34,45,46]. Η

περίοδος επώασης του διαρκεί 3 με 6 μέρες με ικανότητα μετάδοσης από λίγες μέρες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων μέχρι και 3 εβδομάδες, μέσω των αναπνευστικών εκκρίσεων [46]. Η λοίμωξη με EV-D68 χαρακτηρίζεται από την ξαφνική έναρξη των συμπτωμάτων: πυρετό, ρινόρροια, φτέρνισμα, βήχα, δύσπνοια και πονόλαιμο με κύριες επιπλοκές την επιδείνωση του άσθματος και της πνευμονίας [45].

Μολονότι, ο EV-D68 έχει συνδεθεί ως επί το πλείστον με διαταραχές της αναπνευστικής οδού, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή του σε νευρολογικές διαταραχές [39,45]. Συγκεκριμένα, η αύξηση των κρουσμάτων του EV-D68 που παρατηρήθηκε το 2014 και το 2016 συνέπεσε με την αύξηση των περιστατικών οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM) στην ίδια γεωγραφική περιοχή (ΗΠΑ). Η συχνή ανίχνευση του σε δείγματα του αναπνευστικού ασθενών με AFM κατά την ίδια χρονική περίοδο έξαρσης των κρουσμάτων οδήγησε στην ισχυρή επιδημιολογική συσχέτιση του EV-D68 με αυτή την νόσο [42,47].

Η οξεία χαλαρή μυελίτιδα (AFM) είναι μια νευρολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη μυϊκής αδυναμίας ενός ή περισσότερων άκρων [47,48]. Επηρεάζει τη φαιά ουσία της σπονδυλικής στήλης σύμφωνα με απεικονίσεις μαγνητικού συντονισμού (MRI) του νωτιαίου μυελού ασθενών AFM, όπου παρατηρούνται κακώσεις που περιορίζονται κυρίως στην φαιά ουσία και επεκτείνονται σε ένα ή περισσότερα τμήματα της σπονδυλικής στήλης [47-49]. Συνήθως, πριν την εμφάνιση της ασύμμετρης αδυναμίας των άκρων προηγούνται συμπτώματα ιογενούς μόλυνσης που περιλαμβάνουν συμπτώματα της αναπνευστικής οδού (βήχα, ρινόρροια) και της γαστρεντερικής οδού (εμετός, διάρροια) [28,47].

Η AFM έχει συνδεθεί και με άλλους ιούς εκτός από τον EV-D68 όπως είναι ο EV-A71, ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) και οι αδενοϊοί, αλλά αρκετές μελέτες έχουν παρατηρήσει ότι τα παιδιά που προσβάλλονται από EV-D68 επηρεάζονται πιο συχνά από την AFM [48,49]. Η δύσκολη όμως ανίχνευση του EV-D68 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) των ασθενών AFM έχει ως συνέπεια να εμποδίζεται η περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στην παθογένεια της AFM με την μόλυνση από EV-D68 [42].

1.9 Επιδημιολογία

Οι μελέτες μοριακής επιδημιολογίας αποτελούν σημαντική πηγή πληροφοριών όσον αφορά την ποικιλομορφία και την κατανομή των ιών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Μέσω της ανάλυσης της γενετικής ποικιλομορφίας των ιών επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ταξινόμηση τους και την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης και διασποράς τους σε επίπεδο χρόνου και χώρου. Τα στοιχεία αυτά συμβάλλουν σημαντικά στον προσδιορισμό του ρόλου που παίζουν οι ιοί σε ασθένειες καθώς και στην οργάνωση των συστημάτων υγείας για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση μιας επιδημίας [50,51].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι επιδημιολογικές μελέτες του EV-D68. Πρόκειται για έναν ιό που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1962 στην Καλιφόρνια από δείγματα του αναπνευστικού 4 παιδιών με σοβαρές αναπνευστικές διαταραχές και θεωρούνταν από τους πιο σπάνια εμφανιζόμενους ιούς μέχρι το 2010 [28,34]. Ο ρυθμός εμφάνισης του άρχισε να αυξάνεται σε παγκόσμιο επίπεδο αργότερα με τη μεγαλύτερη έξαρση να σημειώνεται το 2014 στις ΗΠΑ (1153 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις) παράλληλα με την ραγδαία αύξηση της οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM). Η λοίμωξη με τον EV-D68 εμφανίζεται προς το τέλος του καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου με την πλειοψηφία των ασθενών να είναι παιδιά [34,40,46].

Μέχρι στιγμής, η θεραπεία της λοίμωξης από τον EV-D68 είναι κυρίως υποστηρικτική εφόσον δεν υπάρχουν διαθέσιμα φάρμακα και εμβόλια για αντιμετώπιση ή πρόληψη της. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την έγκυρη ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού σε δείγματα για την αποφυγή ή τον έλεγχο μιας επιδημίας του. Για τον σκοπό αυτό το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) των ΗΠΑ έχει αναπτύξει νέα, γρήγορα Real-Time PCR τεστ για την ανίχνευση του ιϊκού RNA του EV-D68 ενώ συγχρόνως αναπτύσσονται κι άλλες RT-PCR μέθοδοι που ειδικεύονται στην ανίχνευση του. Η τελική διάγνωση όμως, συνεχίζει να στηρίζεται στη μερική αλληλούχιση του γονιδίου των δομικών πρωτεϊνών VP4-VP2 ή της περιοχής VP1 [28,34,46].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της αντιϊκής δράσης ελληνικών μελιών έναντι του Εντεροϊού D68 σε κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος (RD), όπου γινόταν ταυτόχρονη επώαση του ιού με διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού. Για τον υπολογισμό των ιϊκών αντιγράφων στις διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Real-Time PCR.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα μελιού

Για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν 8 δείγματα μελιών από διάφορες πηγές της Ελλάδας τα οποία διατηρούνταν σε κλειστό χώρο σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 3.1 Δείγματα μελιών, είδος, περιοχή προέλευσης και ημερομηνία παραγωγής τους

<u>Δείγμα μελιού</u>	<u>Τύπος μελιού</u>	<u>Περιοχή προέλευσης</u>	<u>Ημερομηνία παραγωγής</u>
Γλυκάνισος	Ανθόμελο	Βόρεια Εύβοια	2018
Έλατο	Μελιτώματος	Όρος Γκιώνα, Φωκίδα	2018
Θυμάρι	Ανθόμελο	Γαλαξίδι, Φωκίδα	2018
Καστανιά	Ανθόμελο	Άγιο Όρος	2018
Κουμαριά	Ανθόμελο	Άγιο Όρος	2018
Ολύμπου	Πολυανθικό	Όρος Όλυμπος	2016
Αζωρίτικο	Πολυανθικό	Άζωρος, Ελασσόνα	2018
Έλατο & Θυμάρι	Μελιτώματος & Άνθους	Όρος Γκιώνα, Φωκίδα	2018
Manuka	Ανθόμελο	Νέα Ζηλανδία	2018

Χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control):

Το μέλι Manuka: το οποίο είναι διαδεδомένο για την αντιμικροβιακή δράση του, η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή συγκέντρωση του σε μεθυλγλυοξάλη, και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών *in vitro*. Για το λόγο αυτό αποτελεί ιδανικό μέτρο σύγκρισης για την αντιϊκή και κυτταροτοξική δράση των δειγμάτων μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

3.2 Στέλεχος Εντεροϊού D68

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Fermon (California/62) του ιού EV-D68 από την εταιρεία RIVM (Ολλανδία) σε συγκέντρωση 10^2 CCID₅₀/100μl, η οποία εμφανίζει ολική καταστροφή των κυττάρων κατά τη δεύτερη μέρα επώασης με τον ιό κι έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου.

3.3 Κυτταρική σειρά

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου ραβδομυοσαρκώματος RD για την καλλιέργεια του εντεροϊού. Τα κύτταρα του ραβδομυοσαρκώματος αναπτύσσονται ως μονόστιβη καλλιέργεια η οποία καλύπτει την ειδική επιφάνεια πολυστυρενίου της πλαστικής φλάσκας στην οποία φυλάσσονται. Τα κύτταρα RD διατηρούνται σε συνθήκες 37°C, παρουσία 5% CO₂ και θρεπτικού D-MEM εμπλουτισμένου με 2% FBS και 1x αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό. Οι διεργασίες των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιούνταν μέσα σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής υπό την τήρηση ασηπτικών συνθηκών που περιλαμβάνουν την εξωτερική απολύμανση των αντικειμένων που εισέρχονταν στην επιφάνεια εργασίας με 70%v/v διάλυμα αιθανόλης.

3.4 Υπολογισμός του ιϊκού τίτλου

Για την μέτρηση του ιϊκού τίτλου έγινε αρχικά επίστρωση μιας πλάκας μικροτιτλοποίησης των 96 θέσεων με 100μl κυττάρων RD, η οποία τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για 24h. Μετά το πέρας της επώασης κι εφόσον παρατηρούνταν προσκόλληση των κυττάρων στην κάτω επιφάνεια της πλάκας, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του πρότυπου ιϊκού στελέχους από 10⁻¹ έως 10⁻⁸. Από κάθε αραιώση τοποθετήθηκαν 100μl στην πλάκα η οποία τοποθετήθηκε εκ νέου για επώαση στους 37°C. Για τις επόμενες μέρες παρατηρούνταν η κυτταροπαθογόνος δράση του ιού μέχρι να σημειωθεί ολική καταστροφή του αρνητικού μάρτυρα (cell control). Στη συνέχεια ακολούθησε ο υπολογισμός του ιϊκού τίτλου με την χρήση του παρακάτω τύπου:

$$\text{LogCCID}_{50} = L - d (S - 0,5)$$

Όπου:

CCID₅₀ (Cell Culture Infectious Dose): η ποσότητα του ιού που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στο 50% των κυττάρων στόχων

L: ο λογάριθμος της χαμηλότερης αραιώσης που χρησιμοποιήθηκε

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

3.5 Παρασκευή των συγκεντρώσεων

Δείγματα μελιών

Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης χρησιμοποιούνταν 3 δείγματα μελιού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με το μέλι Manuka να χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης για την αντιϊκή δράση των μελιών. Συγκεκριμένα, για ορισμένη συγκέντρωση, κάθε δείγμα μελιού εξετάζονταν σε 3 πηγαδάκια της πλάκας ως προς την αντιϊκή του δράση σε αυτή τη συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα για κάθε δείγμα μελιού ήταν των 128mg/ml, 64mg/ml, 32mg/ml, 16mg/ml, 8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml και 1mg/ml.

Αρχικά όμως, όπως θα φανεί και στη συνέχεια, χρειάστηκε να παρασκευαστούν οι διπλάσιες συγκεντρώσεις, δηλαδή των 256mg/ml, 128mg/ml, 64mg/ml, 32mg/ml, 16mg/ml, 8mg/ml, 4mg/ml και των 2mg/ml για κάθε δείγμα μελιού.

3.6 Μόλυνση της πλάκας

Η μόλυνση της πλάκας μικροτιτλοποίησης πραγματοποιούνταν σε ειδικό απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Αρχικά απομακρύνονταν το θρεπτικό υλικό από την πλάκα που είχε επιστρωθεί την προηγούμενη μέρα ώστε να μπορούσε να ακολουθήσει η προσθήκη των δειγμάτων του μελιού και ο ενοφθαλμισμός με τον ιό.

Σε κάθε πλάκα, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, οι 2 ακριανές στήλες χρησιμοποιούνταν ως αρνητικός μάρτυρας (cell control, C.C.) ο οποίος αποτελούνταν από επιστρωμένα κύτταρα και 200μl D-MEM σε κάθε πηγαδάκι. Μία στήλη λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας (virus control, V.C.) ο οποίος περιείχε 100μl D-MEM και 100μl του ιού EV-D68 και χρησιμοποιούνταν για τη σύγκριση της κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού στα κύτταρα με την κυτταροπαθογόνο δράση του παρουσία μελιού, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση πιθανής αναστολής της δράσης του. Για κάθε δείγμα μελιού χρησιμοποιούνταν μία τριπλέτα στην οποία προστίθενταν από 100μl δείγματος μελιού ορισμένης συγκέντρωσης και 100μl του ιού (honey-virus control, H.V.C.) για την εξέταση της αντιϊκής δράσης του μελιού. Κάθε πηγαδάκι είχε συνολικό όγκο 200μl το οποίο δικαιολογεί και την αρχική παρασκευή των διπλάσιων συγκεντρώσεων καθώς, σύμφωνα με τον νόμο των αραιώσεων, υποδιπλασιάζονταν δίνοντας τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των 128mg/ml, 64mg/ml, 32mg/ml, 16mg/ml, 8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml και 1mg/ml.

C.C. 1^ο Δείγμα μελιού 2^ο Δείγμα μελιού 3^ο Δείγμα μελιού V.C. C.C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
128mg/ml	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
64mg/ml	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
32mg/ml	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16mg/ml	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8mg/ml	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4mg/ml	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2mg/ml	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1mg/ml	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Εικόνα 3.6 Απεικόνιση του τρόπου οργάνωσης της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Η πλάκα διατηρούνταν στους 37°C κι εξετάζονταν κάθε μέρα μέχρι να σημειωθεί ολική καταστροφή του θετικού μάρτυρα (V.C.) από τον ιό, το οποίο συνέβαινε την δεύτερη μέρα. Μέχρι να συμβεί αυτό, καταγραφόταν η κυτταροπαθογόνος δράση που παρατηρούταν σε κάθε πηγαδάκι ως CPE 1⁺: αν είχε καταστραφεί το 25% του συνόλου των κυττάρων, CPE 2⁺: αν είχε καταστραφεί το 50%, CPE 3⁺: αν είχε καταστραφεί το 75% και CPE 4⁺: αν παρατηρούνταν ολική καταστροφή των κυττάρων, δηλαδή 100%. Μόλις παρατηρούνταν CPE 4⁺ στο V.C. η πλάκα διατηρούνταν στους -20°C μέχρι να γίνει η απομόνωση του ιού. Το περιεχόμενο κάθε τριάδας H.V.C. συλλέγονταν σε erpendorf των 2ml (600μl) καθώς και το περιεχόμενο από μία τριάδα του C.C. (600μl) και του V.C. (600μl) σε ξεχωριστά erpendorf των 2ml.

3.7 Εκχύλιση του ιϊκού RNA

Η απομόνωση του ιϊκού στελέχους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης, GuSCN (πρωτόκολλο Casas) σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής. Αναλυτικότερα, σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 10μl γλυκογόνου (5mg/ml), 300μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0,5% N-lauroyl Sarcosine, 1mM DTT, 25mM Sodium Citrate) και 100μl από κάθε δείγμα και μετά από έντονη ανάδευση ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl ισοπροπυλικής αλκοόλης και ακολούθησε έντονη ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Έπειτα,

πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε 14.000 rcf στους 4°C και μετά απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που παρέμεινε προστέθηκαν 500μl 70% αιθανόλης κι ακολούθησε εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rcf στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο από τα δείγματα και προστέθηκαν 100μl απεσταγμένου νερού (ddH₂O) για την επαναδιάλυση του ιζήματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μία ήπια ανάδευση του εναιωρήματος προτού αποθηκευτεί στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση του [52].

3.8 Αντίστροφη μεταγραφή του ιϊκού RNA

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, απαιτείται η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του, δηλαδή της μετατροπής του από RNA σε DNA, ώστε να μπορέσει στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ενίσχυση συγκεκριμένης περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος με την Real-Time PCR.

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν τυχαίοι επτανουκλεοτιδικοί εκκινητές (HEPTAN N7) οι οποίοι θεωρούνται ιδανικοί για την αντίστροφη μεταγραφή των RNA που φέρουν δευτεροταγείς δομές όπως το ιϊκό γονιδίωμα. Με τη χρήση τους επιτυγχάνεται η πλήρη κάλυψη του ιϊκού γονιδιώματος καθώς προσδένονται σε πολλαπλές θέσεις πάνω σε αυτό. Αρχικά παρασκευάστηκε ένα μείγμα (M1) το οποίο περιείχε τους τυχαίους εκκινητές σε συγκέντρωση 100pmol/μl, dNTPs 40mM και ddH₂O και μοιράστηκε σε eppendorf των 500μl σε ποσότητα 7μl. Σε κάθε eppendorf προστέθηκαν 5μl από το αντίστοιχο δείγμα RNA (από την εκχύλιση) κι ακολούθησε σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση τους σε θερμοκυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά. Μετά την επώαση τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο και προστέθηκαν σε αυτά 8μl ενός δεύτερου μείγματος (M2) το οποίο περιείχε 5x FastGene Buffer, 0,1mM DTT, ddH₂O και RT (FastGene Scriptase) (200U/μl). Έπειτα φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή για 3 διαδοχικές επώσεις: μία στους 25°C για 10 λεπτά κατά την οποία γίνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών, μία στους 42°C για 50 λεπτά για τη σύνθεση του cDNA και μία στους 70°C για 15 λεπτά για την αδρανοποίηση του ενζύμου.

3.9 Real-Time PCR

Η Real-Time PCR γνωστή και ως ποσοτική PCR (qPCR) αποτελεί μία μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας-στόχου ενός δείγματος σε πραγματικό χρόνο. Στηρίζεται στην αρχή της μεθόδου της PCR με τη διαφορά όμως ότι πραγματοποιεί τη μέτρηση των προϊόντων στην εκθετική φάση της αντίδρασης και όχι στο τέλος αυτής, όπως συμβαίνει στη συμβατική PCR. Για τη μέτρηση των προϊόντων χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές όπως η SYBR Green Dye I, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα. Ο φθορισμός που εκπέμπουν αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση των αντιγράφων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης κι απεικονίζεται σε ένα σχεδιάγραμμα (Amplification Plot) το οποίο βοηθάει στην ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Το Amplification Plot απεικονίζει τη μεταβολή του φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της Ct. Η τιμή Ct (Cycle threshold) είναι ο πρώτος κύκλος στον οποίο ο φθορισμός του προϊόντος που ανιχνεύεται ξεπερνάει το κατώφλι (threshold). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερη θα είναι η τιμή Ct δηλαδή τόσο πιο νωρίς η ανιχνεύσιμη ποσότητα θα ξεπερνάει το κατώφλι.

Η SYBR Green είναι μία μη ειδική χρωστική που προσδένεται στο δίκλωνο DNA και απορροφά στα 497nm και εκπέμπει στα 520nm. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπει είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Επειδή όμως η SYBR Green προσδένεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA (διμερή εκκινητών, παραπροϊόντα), γίνεται μελέτη της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR στο τέλος της αντίδρασης με την οποία μπορούμε να δούμε αν ενισχύθηκαν τα επιθυμητά προϊόντα. Η καμπύλη τήξης (Melting Curve ή Dissociation Curve) καταγράφει τη μεταβολή του φθορισμού που παρατηρείται όταν το δίκλωνο DNA που είναι δεσμευμένο με τη χρωστική αποδιατάσσεται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η αποδιάταξη του (T_m). Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος και τη σύσταση του τμήματος DNA. Κάθε προϊόν έχει διαφορετική θερμοκρασία αποδιάταξης. Επομένως, περιμένουμε ότι τα επιθυμητά προϊόντα της αντίδρασης θα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) και ότι στο σχεδιάγραμμα της καμπύλης τήξεως θα εμφανίζεται μία καμπύλη με μία κορυφή. Στην περίπτωση επιμόλυνσης ή ύπαρξης παραπροϊόντων θα παρατηρούνται στην καμπύλη κι άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m).

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκριτικής Real-Time PCR κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το virus control (V.C). Με αυτή τη μέθοδο γίνεται σύγκριση της τιμής Ct του virus control με τις τιμές Ct των δειγμάτων, ώστε να προκύψει η σχετική ποσότητα ιικών αντιγράφων για κάθε δείγμα και κάθε συγκέντρωση.

Για την αντίδραση ετοιμάστηκε μείγμα που περιείχε τους εκκινητές ENV2 (5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'), ENV1 (5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3') που αναγνωρίζουν την 5'UTR περιοχή των εντεροϊών. Συγκεκριμένα, το μείγμα περιείχε 50pmol/μl από κάθε εκκινητή, 2x FastGene Mix, 50μM ROX Low και ddH₂O σε τελικό όγκο 17μl/tube. Σε eppendorf των 0,2ml τοποθετήθηκαν 17μl μείγματος και 3μl cDNA του αντίστοιχου δείγματος. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε συσκευή MxPro 3005P στις εξής συνθήκες:

- στους 95°C για 2 min (1 κύκλος) όπου πραγματοποιείται η αρχική αποδιάταξη του DNA
- στους 95°C για 5 sec για την αποδιάταξη του DNA
- στους 60°C για 30sec για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων (40 κύκλους)
- στους 55°C - 95°C για τη δημιουργία της καμπύλης τήξης (Dissociation curve)

3.10 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real-Time PCR σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Συγκεκριμένα αναμίχθηκαν 0,8gr αγαρόζης με 40ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris-Boric acid-EDTA) σε κωνική φιάλη. Ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό για τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης και έπειτα αφέθηκε μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40μl βρομιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA και φθορίζει σε μήκος κύματος 290nm. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδικό υποδοχέα ηλεκτροφόρησης που έφερε χτενάκια, για την δημιουργία θέσεων στις οποίες θα τοποθετούνταν τα δείγματα και αφέθηκε μέχρι να πήκτωσει. Μόλις σταθεροποιούνταν το πήκτωμα, τοποθετούνταν 10μl από κάθε δείγμα τα οποία αναμειγνύονταν πρώτα με τη χρωστική (κυανό της βρωμοφαινόλης) στις θέσεις του πηκτώματος. Τέλος, χρησιμοποιούνταν ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder) των 100bp (5μl) εφόσον το επιθυμητό προϊόν μας είναι μεγέθους 129bp. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε

συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 30 λεπτά σε 120V και μετά σε ειδική συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για την παρατήρηση των ζωνών.

3.11 MTT assay

Είναι μία χρωματομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και την αποτίμηση της κυτταροτοξικότητας μιας ουσίας. Στηρίζεται στην ενζυμική αναγωγή του κίτρινου διαλύματος MTT (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ)-2-5-διφαινυλοτετραζόλιο) σε μία αδιάλυτη ένωση, τη φορμαζάνη, υπό μορφή μωβ κρυστάλλων, από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά ζωντανά κύτταρα. Η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης οδηγεί στην παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος η ποσοτικοποίηση του οποίου γίνεται με φασματοφωτομέτρηση στα 570nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ζωντανών κυττάρων του δείγματος.

Η μέθοδος MTT χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα για μια πιο ακριβή προσέγγιση της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων μελιού. Αρχικά έγινε επίστρωση μίας πλάκας μικροτιλοποίησης 96 θέσεων με κύτταρα RD και θρεπτικό υλικό MEM συγκέντρωσης 2% FBS η οποία τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για μία μέρα, ώστε να καλυφθεί επαρκώς η επιφάνεια της πλάκας. Κατά τη διαδικασία της επίστρωσης αφέθηκε κενή η στήλη 12 για να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό. Την επόμενη μέρα, εφόσον είχε παρατηρηθεί επαρκής κάλυψη της πλάκας από κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις για κάθε δείγμα μελιού σε θρεπτικό μέσο MEM χωρίς προσθήκη FBS, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1mg/ml και να ακολουθήσει η επώαση. Πριν την επώαση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε μελιού, γινόταν απόρριψη του θρεπτικού υλικού. Κατά τη διαδικασία αυτή, η στήλη 11 συμπληρωνόταν μόνο με θρεπτικό υλικό απουσία μελιού για να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, καθώς περιείχε μόνο ζωντανά κύτταρα. Στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετούνταν για επώαση στους 37°C για μία μέρα. Μετά το πέρας των 24 ωρών, γινόταν προσθήκη 10μl MTT των 50μg σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας και ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 1,5 ώρα, ώστε να δημιουργηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης στα ζωντανά κύτταρα. Έπειτα, γινόταν προσθήκη 100μl διαλύματος SDS σε αραιό HCl για την διαλυτοποίηση των κρυστάλλων που είχαν δημιουργηθεί στα ζωντανά κύτταρα αλλά και για αναστολή πιθανής επίδρασης του δείκτη ερυθρό της φαινόλης που υπάρχει στο θρεπτικό προκαλώντας αλλαγή στο χρώμα του λόγω

της μείωσης του pH. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα όποια αλλαγή παρατηρούνταν στα πηγαδάκια να οφείλονταν μόνο στους κρυστάλλους φορμαζάνης και να μπορεί να μετρηθεί με απορρόφηση σε μήκος κύματος 570nm. Τέλος, με βάση τις τιμές απορρόφησης που προέκυψαν υπολογίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση με τον εξής τύπο:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} = \frac{\text{Μέση τιμή απορρόφησης για κάθε συγκέντρωση} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης του τυφλού}}{\text{Μέση τιμή απορρόφησης αρνητικού μάρτυρα} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης του τυφλού}}$$

3.12 Υπολογισμός της τιμής CC50

Ο έλεγχος της τοξικότητας πραγματοποιείται μέσω του υπολογισμού της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%), η οποία χρησιμοποιείται ως μέτρο για την έκφραση του επιπέδου τοξικότητας και ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία θα θανατώσει το ήμισυ (50%) των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η τιμή CC_{50} υπολογίστηκε με τη μέθοδο MTT που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε μία γραφική παράσταση με τις συγκεντρώσεις του μελιού που χρησιμοποιήθηκαν και των τιμών που προέκυψαν από την εφαρμογή του παραπάνω τύπου. Από την εξίσωση που προέκυψε από την γραφική παράσταση, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μελιού στην οποία παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια, δηλαδή η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (CC_{50}).

3.13 Υπολογισμός της τιμής IC50

Η τιμή IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή κατά το ήμισυ (50%) του ιϊκού τίτλου *in vitro*. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τη μικρότερη συγκέντρωση κάθε μελιού, στην οποία αναστέλλεται κατά 50% το σύνολο των ιϊκών αντιγράφων. Με βάση τα αποτελέσματα της qPCR για την αντιϊκή δράση του μελιού, εφαρμόστηκε η μέθοδος $2^{\Delta Ct}$ για την δημιουργία γραφικής παράστασης στο Excel, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} για κάθε μέλι. Η μέθοδος $2^{\Delta Ct}$ αποτελεί έναν εύκολο τρόπο ανάλυσης της

μεταβολής του αριθμού των ιϊκών αντιγράφων που παρατηρείται σε κάθε υπό μελέτη δείγμα ως προς τον αριθμό των ιϊκών αντιγράφων του θετικού μάρτυρα (V.C.). Ο θετικός μάρτυρας (V.C.), όπως έχει αναφερθεί, αποτελείται μόνο από κύτταρα ενοφθαλμισμένα με το ιϊκό στέλεχος του EV-D68, επομένως αναμένεται να έχει τον υψηλότερο αριθμό ιϊκών αντιγράφων, δηλαδή την χαμηλότερη τιμή Ct (Cycle threshold) στα αποτελέσματα της qPCR. Αντίθετα, τα υπό μελέτη δείγματα αναμένεται να έχουν χαμηλότερο αριθμό ιϊκών αντιγράφων λόγω της ανασταλτικής δράσης του εκάστοτε μελιού, δηλαδή υψηλότερες τιμές Ct σε σχέση με του θετικού μάρτυρα (V.C.). Αρχικά, υπολογίζεται η διαφορά του Ct κάθε υπό μελέτη δείγματος από το Ct του θετικού μάρτυρα (V.C.) με εφαρμογή του τύπου: $\Delta Ct = Ct_{V.C.} - Ct_{\text{υπό μελέτης δείγματος}}$. Η τιμή ΔCt εκφράζει την μεταβολή των ιϊκών αντιγράφων των υπό μελέτη δειγμάτων σε σχέση με τον αριθμό των ιϊκών αντιγράφων του V.C. και με βάση όσα αναφέρθηκαν, είναι μία αρνητική τιμή. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η τιμή $2^{\Delta Ct}$ η οποία εκφράζει τη σχετική συγκέντρωση (RC: Relative Concentration) των ιϊκών αντιγράφων σε κάθε δείγμα ως προς τον αριθμό ιϊκών αντιγράφων του θετικού μάρτυρα (V.C.). Για τον θετικό μάρτυρα που δεν περιέχει μέλι δεν υπάρχει πιθανή αναστολή του ιϊκού τίτλου του, άρα η ΔCt ισούται με μηδέν ($\Delta Ct = 0$) και $2^{\Delta Ct} = 2^0 = 1$, επομένως για να υπολογίσουμε την αντιϊκή δράση, τον βαθμό αναστολής δηλαδή που προκαλεί κάθε δείγμα μελιού, θα εφαρμόσουμε τον ακόλουθο τύπο: $1 - 2^{\Delta Ct}$ [53]. Οι τιμές που θα προκύψουν από αυτόν τον τύπο και οι συγκεντρώσεις του μελιού που χρησιμοποιήθηκαν μας δίνουν στο Excel την γραφική παράσταση από την εξίσωση της οποίας θα υπολογιστούν οι τιμές IC₅₀ των δειγμάτων.

4. Αποτελέσματα

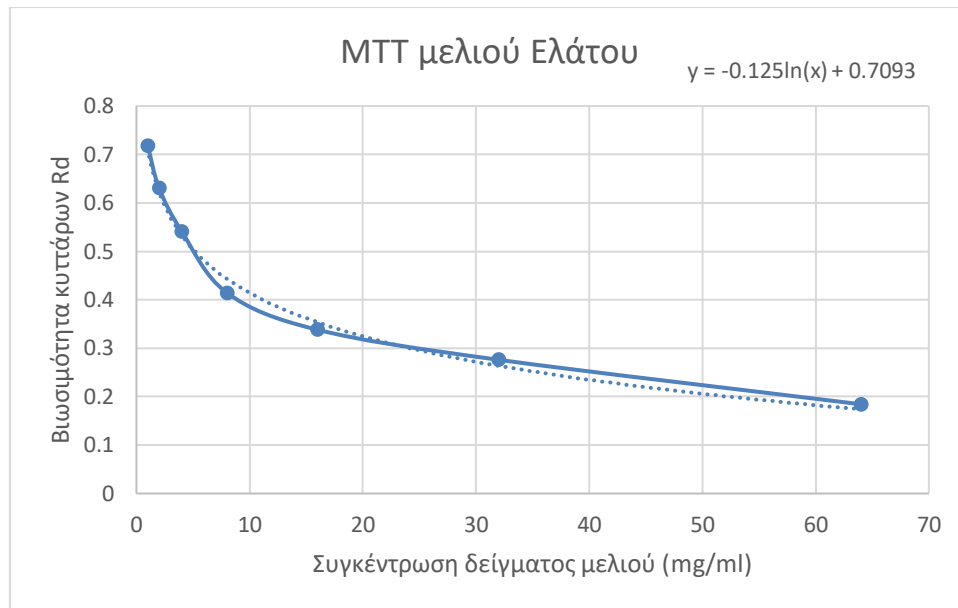
4.1. Προσδιορισμός κυτταρικής τοξικότητας μέσω των τιμών CC₅₀

Όπως προαναφέρθηκε, για να εκτιμήσουμε το επίπεδο της κυτταροτοξικής δράσης κάθε δείγματος μελιού είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η τιμή CC₅₀ για κάθε δείγμα, η συγκέντρωση δηλαδή που καταστρέφεται το 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια. Η επίλυση της εξίσωσης που προέκυψε από την γραφική παράσταση των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων ως προς το ποσοστό βιωσιμότητας που υπολογίστηκε για κάθε μέλι, οδήγησε στις τιμές CC₅₀ που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

<u>Δείγμα Μελιού</u>	<u>CC₅₀(mg/ml)</u>
Γλυκάνισος	1.05 ± 0.13
Αζωρίτικο	3.34 ± 0.06
Manuka	4.31 ± 0.08
Ολύμπου	4.84 ± 0.16
Ελάτου	5.34 ± 0.05
Θυμαριού & Ελάτου	6.65 ± 0.06
Καστανιάς	9.45 ± 0.04
Κουμαριά	10 ± 0.075
Θυμάρι	10.66 ± 0.08

Πίνακας 4.1. Δείγματα μελιού του πειράματος και οι τιμές CC₅₀ (mg/ml) μαζί με την τυπική απόκλιση που εμφάνισαν κατά αύξουσα σειρά.

Ενδεικτικά, παρουσιάζεται η γραφική παράσταση των συγκεντρώσεων του δείγματος μελιού Ελάτου ως προς το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων RD, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η τιμή CC₅₀ για το συγκεκριμένο μέλι (5.34±0.05 mg/ml).



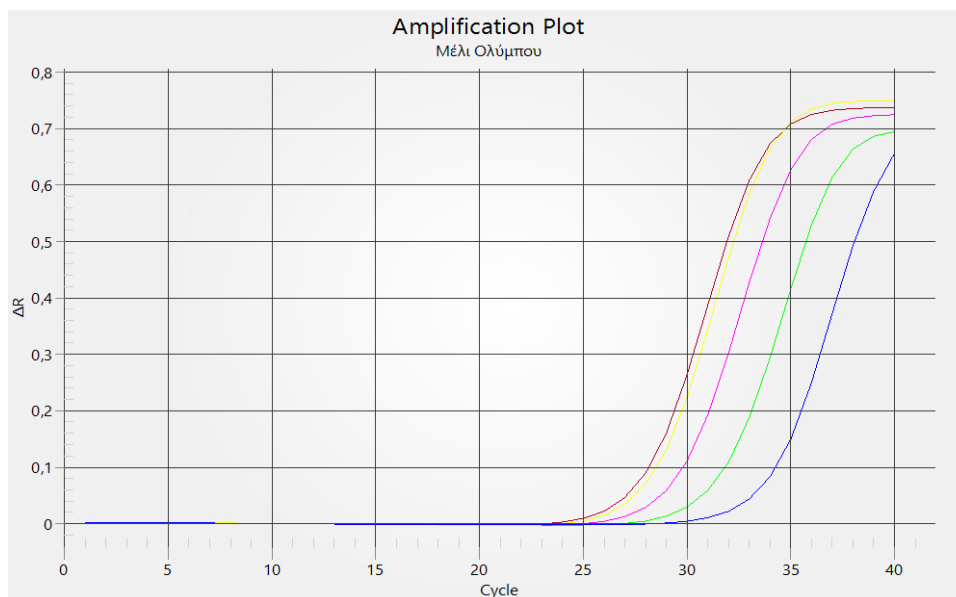
Εικόνα 4.1: Υπολογισμός του CC_{50} μέσω του MTT για το μέλι Ελάτου

Με βάση τις παραπάνω τιμές το μέλι θυμαριού εμφανίζει τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελιού καθώς έχει τη μεγαλύτερη τιμή CC_{50} , δηλαδή απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση του, συγκεκριμένα $10,66 \pm 0,08 \text{ mg/ml}$, για να εμφανίσει σημαντική κυτταροτοξική δράση. Εξίσου υψηλές είναι οι τιμές CC_{50} των δειγμάτων Κουμαριάς και Καστανιάς με τιμές $10 \pm 0,075 \text{ mg/ml}$ και $9,45 \pm 0,04 \text{ mg/ml}$ αντίστοιχα, που αποτελούν ένδειξη χαμηλότερης κυτταροτοξικής δράσης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα και μάλιστα από το μέλι Manuka ($4,31 \pm 0,08 \text{ mg/ml}$) το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στον επιστημονικό χώρο και χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης στις ερευνητικές μελέτες. Αντιθέτως, τα δείγματα Αζωρίτικου ($3,34 \pm 0,06 \text{ mg/ml}$) και Γλυκάνισου εμφανίζουν την μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση με τον Γλυκάνισο να καταστρέφει το ήμισυ των κυττάρων σε συγκέντρωση μόλις $1,05 \text{ mg/ml}$.

4.2 Προσδιορισμός αντιϊκής δράσης μέσω των τιμών IC_{50}

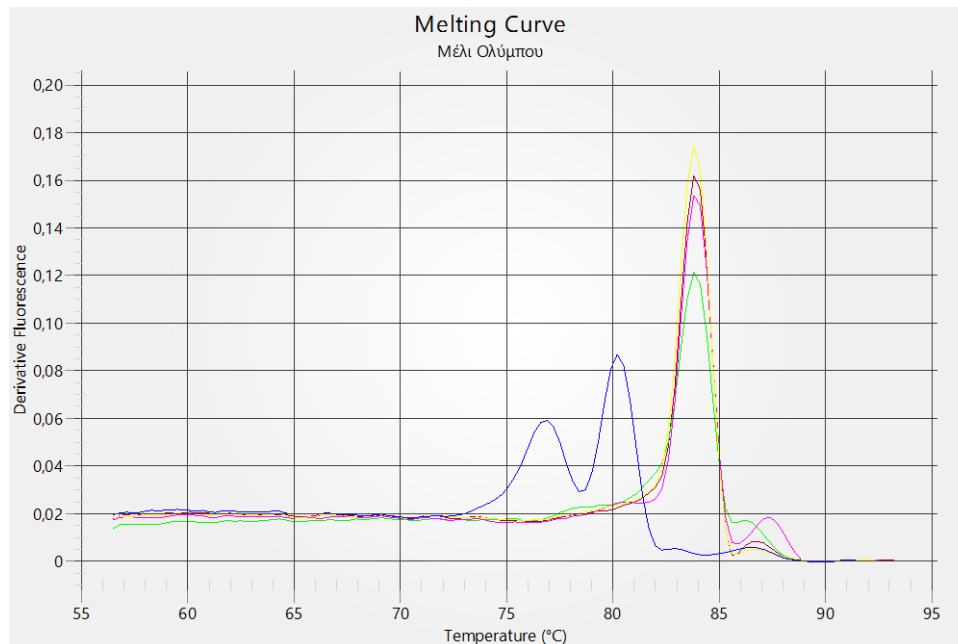
Από τις αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 16 mg/ml , 8 mg/ml και 4 mg/ml από κάθε δείγμα μελιού, για την διερεύνηση της αντιϊκής δράσης έναντι του EV-D68. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στην προστατευτική δράση που εμφάνιζαν οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στα κύτταρα παρουσία ιού μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης. Κατά συνέπεια, περιμέναμε ότι στο

Amplification Plot που προέκυψε από την qPCR για τις δεδομένες συγκεντρώσεις κάθε δείγματος μελιού, οι τιμές Ct των υπό μελέτη δειγμάτων να είναι μεγαλύτερες από την τιμή Ct του θετικού μάρτυρα (V.C). Αυτό οφείλεται στην ανασταλτική δράση του μελιού που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ιικών αντιγράφων στα δείγματα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (V.C.), και συνεπώς, την απαίτηση να γίνουν περισσότεροι κύκλοι για να ενισχυθεί η αλληλουχία-στόχος, άρα μεγαλύτερη τιμή Ct. Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχεδιάγραμμα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μελιού του Ολύμπου, τόσο αυξάνεται και η αναστολή του ιικού τίτλου του EV-D68 στο δείγμα, και συνεπώς και ο αριθμός Ct.



Εικόνα 4.2.1: Amplification plot της Real-Time PCR για τις συγκεντρώσεις του μελιού Ολύμπου. (πράσινο: 8mg/ml, ροζ: 4mg/ml, κίτρινο: 2mg/ml, κόκκινο: θετικός μάρτυρας, μπλε: αρνητικός μάρτυρας)

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της καμπύλης τήξης (Melting Curve) των προϊόντων της qPCR σε κάθε δείγμα μελιού για να εξακριβώσουμε ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Όπως παρατηρείται στο παρακάτω διάγραμμα, όλα τα υπό μελέτη δείγματα του μελιού του Ολύμπου εμφάνισαν μία καμπύλη με μία κορυφή στην ίδια ακριβώς θερμοκρασία αποδιάταξης, επισημαίνοντας την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος.



Εικόνα 4.2.2: Melting curve analysis της Real-Time PCR για τις συγκεντρώσεις του μελιού Ολύμπου. (πράσινο: 8mg/ml, ροζ: 4mg/ml, κίτρινο: 2mg/ml, κόκκινο: θετικός μάρτυρας, μπλε: αρνητικός μάρτυρας)

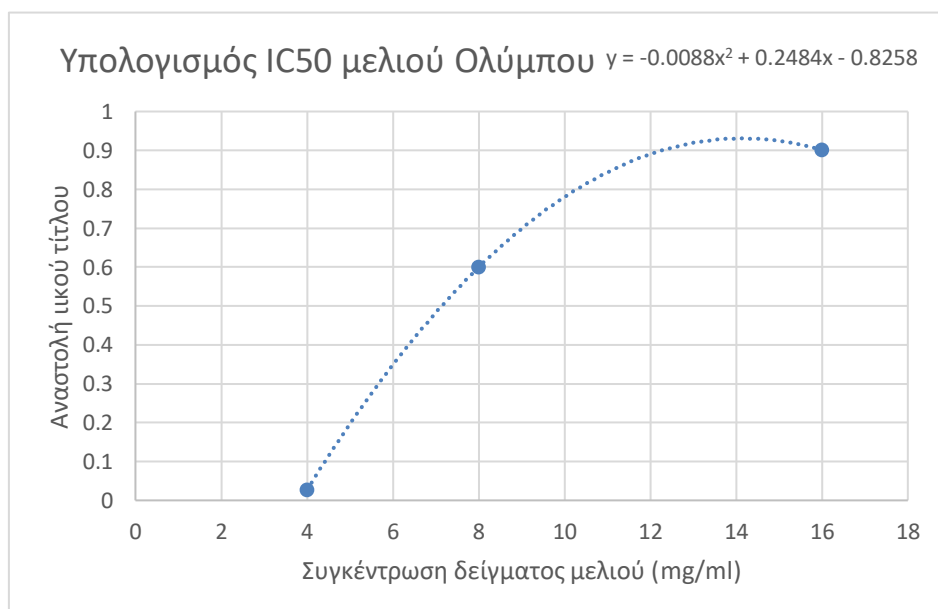
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qPCR και την εφαρμογή της μεθόδου $2^{\Delta C_t}$, σχεδιάστηκε γραφική παράσταση στο Excel από την εξίσωση της οποίας προέκυψαν οι παρακάτω τιμές IC_{50} για κάθε μέλι.

<u>Δείγματα Μελιού</u>	<u>IC_{50} (mg/ml)</u>
Αζωρίτικο	3.92
Θυμαριού & Ελάτου	5.92
Manuka	6.42
Ολύμπου	7.14
Ελάτου	7.91
Καστανιάς	8.8
Γλυκάνισος	13.72
Θυμάρι	ND
Κουμαριά	ND

Πίνακας 4.2. Δείγματα μελιού και οι αντίστοιχες τιμές IC_{50} (mg/ml) που εμφάνισαν κατά αύξουσα σειρά.

Η τιμή IC₅₀ ορίζει την ελάχιστη συγκέντρωση μελιού που απαιτείται για να επιτευχθεί αναστολή του ιικού τίτλου κατά το ήμισυ (50%) σε μία κυτταροκαλλιέργεια. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ μίας ουσίας τόσο πιο ισχυρή είναι η αντιϊκή της δράση. Το Αζωρίτικο μέλι, όπως παρατηρείται στον παραπάνω πίνακα, παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 3,92mg/ml, όπως και το μέλι Θυμαριού και Ελάτου σε συγκέντρωση 5,92mg/ml έχοντας και τα 2 μικρότερη τιμή IC₅₀ από το μέλι Manuka (6,42mg/ml) που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης στην παρούσα ερευνητική μελέτη. Αντίθετα, το μέλι Γλυκάνισου εμφάνισε σημαντική αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 13,72mg/ml έχοντας την υψηλότερη τιμή IC₅₀, επομένως τη χαμηλότερη αντιϊκή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν. Αξίζει να αναφερθεί ότι για τα δείγματα μελιού του Θυμαριού και της Κουμαριάς δεν υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ καθώς δεν ανιχνεύτηκε αντιϊκή δράση (ND:Not Detected) η οποία να σχετίζεται με την αλλαγή της συγκέντρωσης του μελιού.

Η παρακάτω γραφική παράσταση αποτελεί παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο έγινε ο υπολογισμός της τιμής IC₅₀ για το μέλι Ολύμπου με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την qPCR.



Εικόνα 4.2.3: Υπολογισμός του IC₅₀ μέσω των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR για το μέλι Ολύμπου

5. Συζήτηση

Η διαχρονική αξία του μελιού ως θεραπευτικού μέσου αποτέλεσε την αιτία να γίνει αντικείμενο πολλών ερευνών. Η αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης δράση του καθώς και η ικανότητα του να επιταχύνει την επούλωση επιφανειακών πληγών και εγκαυμάτων, ήταν ήδη γνωστές από την αρχαιότητα [15]. Με το πέρασμα των χρόνων διαπιστώθηκε και η ευεργετική του δράση στις καρδιαγγειακές, μεταβολικές και γαστρεντερικές διαταραχές καθώς και η αντικαρκινική, αντιμυκητιακή και αντιϊκή δράση του [15,17]. Παρόλα αυτά, η χρήση του μελιού στην σύγχρονη ιατρική παραμένει ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα για την επιστημονική κοινότητα [54].

Η αδυναμία των σημερινών φαρμάκων στην καταπολέμηση ανθεκτικών μικροβίων και η αναζήτηση εναλλακτικών φυσικών ουσιών επανέφεραν το μέλι στο επίκεντρο της έρευνας. Συγκεκριμένα, μελέτες *in vitro* έχουν αναδείξει τη συνεργική δράση του μελιού Manuka με γνωστά αντιϊκά φάρμακα, zanamivir και oseltamivir, στην αναστολή της αντιγραφής του ιού της γρίπης, αλλά και γενικότερα την αντιϊκή δράση του μελιού κατά του HIV, του απλού έρπη (HSV) και του έρπητα ζωστήρα (VZV) [14,55,56]. Η πλούσια σύσταση του μελιού Manuka σε μεθυλγλυοξάλη και πολυφαινόλες, που έχουν αναγνωρισθεί για την συμβολή τους στην καταστολή της ανάπτυξης των ιών μέσω αναστολής της ιϊκής αντιγραφής τους, καθώς και η χρήση του στις περισσότερες *in vitro* μελέτες, το καθιστά έναν έγκυρο θετικό μάρτυρα για την βιβλιογραφία [14]. Στην παρούσα εργασία, το μέλι Manuka χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης της αντιϊκής δράσης 8 δειγμάτων μελιού ελληνικής προέλευσης έναντι του εντεροϊού D68.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία αύξηση των σοβαρών περιστατικών αναπνευστικής λοίμωξης που οφείλονται στον συγκεκριμένο ιό. Η ευρεία εξάπλωση του EV-D68 καθώς και η συσχέτιση του με την εμφάνιση της οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM) στα παιδιά, μιας σπάνιας σοβαρής νευρολογικής ασθένειας που θυμίζει την πολιομυελίτιδα, οδήγησαν στην περαιτέρω μελέτη του. Πρόκειται για ένα ιϊκό στέλεχος με αυξημένο ρυθμό μεταλλάξεων και συνεπώς μεταβαλλόμενη αντιγονικότητα και αυξημένη μολυσματικότητα προκαλώντας σοβαρές αναπνευστικές διαταραχές και υψηλότερη πιθανότητα εκδήλωσης νευρολογικών διαταραχών σε σχέση με άλλους εντεροϊούς [57,58]. Επιπλέον, σε αντίθεση με τους περισσότερους εντεροϊούς, μεταδίδεται μέσω της αναπνευστικής οδού με κύρια συμπτώματα τον βήχα, τον πυρετό, τη ρινόρροια, τον ερεθισμένο λαιμό με αποτέλεσμα να

συγγέεται με τους ρινοϊούς [45]. Όμως, σε σπάνιες περιπτώσεις, ο EV-D68 μπορεί να προσβάλει το κεντρικό νευρικό σύστημα με αποτέλεσμα μία αναπνευστική λοίμωξη να εξελιχθεί μετά από μία εβδομάδα περίπου σε μία σοβαρή νευρολογική ασθένεια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM) [57].

Προς το παρόν, η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της λοίμωξης από EV-D68 στηρίζεται στην υποστηρικτική θεραπεία καθώς δεν υπάρχουν εμβόλια και φάρμακα για την καταπολέμηση του. Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη χρήση φαρμάκων που είχαν σχεδιαστεί για την αντιμετώπιση άλλων RNA ιών στην ερευνητική μελέτη του EV-D68 με σκοπό την διέγερση της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού ή την παρεμπόδιση του κύκλου αντιγραφής του. Ακόμη κι αυτά όμως, δεν εμφανίζουν την ίδια αποτελεσματικότητα που εμφάνιζαν στις *in vitro* μελέτες, στα πειραματόζωα και στους ανθρώπους. Το στάδιο της λοίμωξης από EV-D68 κατά το οποίο γίνεται η έναρξη της θεραπείας φαίνεται να έχει καθοριστική σημασία για την θετική έκβαση της θεραπείας [57].

Ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων που παρουσιάζουν τα νέα στελέχη του EV-D68 καθώς και ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων που παρατηρήθηκε το 2014, 2016 και 2018 προειδοποιούν για μία επερχόμενη έξαρση του, η οποία έχει ανασταλεί λόγω των μέτρων της πανδημίας COVID-19. Η συνεχής αναζήτηση μίας συνδυαστικής θεραπείας που θα προλαμβάνει το ενδεχόμενο εμφάνισης ανθεκτικότητας από το ιικό στέλεχος του EV-D68, κρίνεται απαραίτητη [57,58].

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη γίνεται μία προσπάθεια να διερευνηθεί η πιθανή ευεργετική δράση του μελιού στην μείωση του ιικού τίτλου του EV-D68 *in vitro*. Κάθε υπό μελέτη δείγμα εξετάστηκε ως προς την κυτταροτοξική του δράση σε κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (RD) και ως προς την αντιϊκή του δράση έναντι του EV-D68, σε συγκεντρώσεις των 128mg/ml, 64mg/ml, 32mg/ml, 16mg/ml, 8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml και 1mg/ml. Συγκεκριμένα, για τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT για τον προσδιορισμό του ποσοστού βιωσιμότητας των κυττάρων σε κάθε συγκέντρωση, και για τον υπολογισμό των τιμών CC_{50} μέσω της εξίσωσης της γραφικής παράστασης που προέκυπτε στο Excel.

Παράλληλα, για την μελέτη της αντιϊκής δράσης, πραγματοποιούνταν αραίωση κάθε δείγματος μελιού σε θρεπτικό μέσο D-MEM για να δημιουργηθούν οι επιθυμητές προς μελέτη συγκεντρώσεις, οι οποίες τοποθετούνταν σε επιστρωμένη με κύτταρα πλάκα μικροτιτλοποίησης, ώστε να ακολουθήσει ο ενοφθαλμισμός με το πρότυπο στέλεχος του EV-

D68 συγκέντρωσης 10^2 CCID₅₀/100μl. Κάθε συγκέντρωση των υπό μελέτη δειγμάτων εξετάζονταν σε 3 πηγαδάκια της πλάκας μέσω οπτικού μικροσκοπίου σε καθημερινή βάση, ενώ ταυτόχρονα σημειωνόταν η κυτταροπαθογόνος δράση (CPE) του ιού παρουσία μελιού σε σύγκριση με του θετικού μάρτυρα (V.C.). Η προστατευτική δράση που παρατηρήθηκε μικροσκοπικά στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις των 16mg/ml, 8mg/ml και 4mg/ml οδήγησε στην απομόνωση τους, την εκχύλιση του RNA τους και στην μετατροπή του σε cDNA μέσω της RT-PCR ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει ενίσχυση της VP1 περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος με την Real-Time PCR. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος $2^{\Delta Ct}$ στα αποτελέσματα της qPCR για τον υπολογισμό της τιμής IC₅₀ για κάθε δείγμα μελιού με επίλυση εξίσωσης της αντίστοιχης καμπύλης που σχεδιάζονταν στο Excel.

Γενικά, για να θεωρηθεί ένα μέλι ιδανικό ως προς την αντιϊκή δράση του πρέπει να έχει υψηλή τιμή CC₅₀ και χαμηλή τιμή IC₅₀. Η υψηλή τιμή CC₅₀ υποδεικνύει χαμηλή κυτταροτοξική δράση του μελιού, καθώς απαιτείται υψηλή συγκέντρωση του για να καταστρέψει το 50% μίας μη ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας, ενώ η χαμηλή τιμή IC₅₀ υποδεικνύει υψηλή αντιϊκή δράση του μελιού καθώς σημαίνει ότι επιτυγχάνει να μειώσει σε σημαντικό ποσοστό τον ιϊκό τίτλο του EV-D68 σε μικρή συγκέντρωση. Επομένως, η αποτελεσματικότητα του μελιού κρίνεται από το περιθώριο που υπάρχει ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των CC₅₀ (υψηλή τιμή) και IC₅₀ (χαμηλή τιμή) καθώς εκφράζει την επιλεκτικότητα της δράσης του μελιού ως προς το ιϊκό στέλεχος σε σχέση με το κύτταρο ξενιστή.

Με βάση τις τιμές CC₅₀ και IC₅₀ που υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το μέλι της Καστανιάς με $CC_{50}/IC_{50}=1,07$ δηλαδή τιμή CC₅₀ αρκετά υψηλότερη από την τιμή IC₅₀, εμφανίζει ισχυρή αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 8,8mg/ml χωρίς να καταστρέφει τα κύτταρα. Ομοίως, το δείγμα θυμαριού και ελάτου με $CC_{50}/IC_{50}=1,12$ εμφανίζει σημαντική ανασταλτική δράση στον ιϊκό τίτλο του EV-D68 σε συγκέντρωση 5,92mg/ml, και αρκετά χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα ($CC_{50}=6,65$ mg/ml) από το μέλι Manuka ($CC_{50}=4,31$ mg/ml) που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης. Για τα υπόλοιπα δείγματα παρατηρούνται υψηλότερες τιμές IC₅₀ από τις τιμές CC₅₀ με χαρακτηριστικό παράδειγμα το μέλι Γλυκάνισου, το οποίο εμφανίζει την υψηλότερη τιμή $IC_{50}=13,72$ mg/ml από όλα τα δείγματα, αλλά και την χαμηλότερη τιμή $CC_{50}=1,05$ mg/ml. Στην περίπτωση αυτή δεν μπορούμε να αποδώσουμε την σημαντική μείωση του ιϊκού τίτλου που παρατηρείται στη συγκέντρωση των 13,72mg/ml στην αντιϊκή δράση του μελιού Γλυκάνισου διότι έχει εμφανίσει πολύ υψηλή κυτταροτοξική δράση σε συγκέντρωση μόλις

1,05mg/ml. Κατά συνέπεια, η μείωση των ιικών αντιγράφων που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων από την κυτταροτοξική δράση του μελιού και όχι από την ανασταλτική του επίδραση πάνω στο ιικό στέλεχος.

Εν τέλει, συμπεραίνουμε ότι τα δείγματα μελιού της Καστανιάς και του Θυμαριού - Ελάτου εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, ακόμη κι από το μέλι Manuka, συνδυάζοντας ταυτόχρονα την υψηλή αντιϊκή δράση έναντι του EV-D68 και την υψηλή προστατευτική δράση σε κύτταρα RD. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η επιστημονική ενασχόληση με τη δράση των συγκεκριμένων δειγμάτων, καθώς και η διερεύνηση της αντιϊκής δράσης κι άλλων ελληνικών μελιών.

6. Βιβλιογραφία

1. Wright G.A, Nicolson S.W, Shafir S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu.Rev.Entomol.*2018.63:327-44. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>
2. Eyer M, Neumann P, Dietemann V. A Look into the Cell: Honey Storage in Honey Bees, *Apis mellifera*. *PLoS ONE.*2016.11(8):e0161059. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161059>
3. Ajibola A. Novel Insights into the Health Importance of Natural Honey. *Malays J Med Sci.*2015.22(5):7-22
4. Olaitan P.B, Adeleke O.E, Ola I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci.*2007.7(3):159-165
5. Alvarez-Suarez J.M, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab.*2010.3:15-23. Available from: doi:10.1007/s12349-009-0051-6
6. Saranraj P, Sivasakthi S, Feliciano G.D. Pharmacology of Honey: A Review. *Adv Biol Res.*2016.10(4):271-289. Available from: <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2016.10.4.104104>
7. Kritsky G. The quest for the perfect hive: ancient Mediterranean origins. *Beekeeping in the Mediterranean from antiquity to the present.*2018.4:50-55
8. Nayik G.A, Shah T. R, Muzaffar K, Wani S. A, Gull A, Majid I, Bhad F.M. Honey: its history and religious significance: a review. *UJP.*2014.3(1):5-8
9. Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodríguez P, Manna PP, Zhang J et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules.*2018.23(9):2322 Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
10. Albaridi N.A. Antibacterial Potency of Honey. *Int.J.Microbiol.*2019. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>
11. Seraglio SKT, Silva B, Bergamo G, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Fett R, Costa ACO. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res. Int.*2019.119:44-66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.028>
12. Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML. Honey as a Complementary Medicine. *Integr.Med.Insights.*2017.12:1-15. Available from: <https://doi.org/10.1177/1178633717702869>
13. Hussain MB. Role of Honey in Topical and Systemic Bacterial Infections. *JACM.*2018.24(1):15-24. Available from: <https://doi.org/10.1089/acm.2017.0017>

14. Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza Viral Effects of Honey *In Vitro*: Potent High Activity of Manuka Honey. Arch Med Res.2014.45:359-365. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.05.006>
15. Nolan V.C, Harrison J, Cox JAG. Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. Antibiotics.2019.8:251. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
16. Alvarez-Suarez J.M, Gasparini M, Forbes-Hernández T.Y, Mazzoni L, Giampieri F. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. Foods.2014.3:420-432. Available from: <https://doi.org/10.3390/foods3030420>
17. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. Front Pharmacol.2017.8(412). Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>
18. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. Pharmacognosy Res.2017.9(2):121-127. Available from: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647>
19. 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.2013.8(3):100-4.
20. Vallianou N.G, Gounari P, Skourtis A, Panagos J, Kazazis C. Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. General Med.2014.2:1. Available from: <https://dx.doi.org/10.4172/2327-5146.1000132>
21. Ahmed S, Sulaiman S.A, Baig A.A, Ibrahim M, Liaqat S, Fatima S et al. Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. Oxid.Med.Cell.Longev.2018. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
22. Afroz R, Tanvir EM, Zheng W, Little PJ. Molecular Pharmacology of Honey. Clin Exp Pharmacol.2016.6:3. Available from:<https://doi.org/10.4172/2161-1459.1000212>
23. Θρασυβούλου Α, Μανίκης Ι, Τανανάκη Χ, Τσέλλιος Δ, Καραμπουρνιώτη Σ, Δήμου Μ. Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος, 1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2002
24. Carter D.A, Blair S.E, Cokcetin N.N, Bouzo D, Brooks P, Schothauer R, Harry E.J. Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative. Front. Microbiol.2016.7:569. Available from:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00569>
25. Imamura T. and Oshitani H. Global reemergence of enterovirus D68 as an important pathogen for acute respiratory infections. Rev.Med.Virol.2015.25:102-104. Availablefrom: <https://doi.org/10.1002/rmv.1820>
26. Norkin LC. Virology: molecular biology and pathogenesis. Washington, DC: ASM Press; 2010

27. Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J.Biomed.Sci.*2009.16:103 Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/103>
28. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol.Spectrum.*2016.4(3):EI10-0018-2016. Available from: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0018-2016>
29. Wells AI, Coyne CB. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses.*2019.11(5);460 Available from: <https://doi.org/10.3390/v11050460>
30. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molecular Virology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013
31. Wang-Shick R. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses.* Academic Press; 2017
32. van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld JM. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses.*2015.7(8):4529-62 Available from: <https://doi.org/10.3390/v7082832>
33. Liu Y, Sheng J, Fokine A, Meng G, Shin WH, Long F. et al. Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science.*2015.347(6217);71-74. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1261962>
34. Xiang Z, Wang J. Enterovirus D68 and Human Respiratory Infections. *Semin.Respir.Crit.Care.Med.*2016.37;578-585. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1584795>
35. Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. *Desk Encyclopedia of General Virology.* Academic Press; 2010
36. Kloc A, Rai DK, Rieder E. The Roles of Picornavirus Untranslated Regions in Infection and Innate Immunity. *Front.Microbio.*2018.9.485. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00485>
37. Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's *Medical Microbiology.* McGraw-Hill Education-Europe, 27th Edition; 2016
38. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as *ABC.* *Viruses.*2016.8(1);16. Available from: <https://doi.org/10.3390/v8010016>
39. Foster CB, Friedman N, Carl J, Piedimonte G. Enterovirus D68: A clinically important respiratory enterovirus. *Cleve Clin J Med.*2015.82(1);26-31. Available from: <https://doi.org/10.3949/ccjm.82a.14166>
40. Cassidy H, Poelman R, Knoester M, Van Leer-Buter CC, Niesters HGM. Enterovirus D68-The New Polio?. *Front.Microbiol.*9;2677. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02677>
41. Wen X, Sun D, Guo J, Elgner F, Wang M, Hildt E, Cheng A. Multifunctionality of structural proteins in the enterovirus life cycle. *Future Microbiol.*2019.14(13). Available from: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0127>

42. Sun J, Hu XY, Yu XF. Current Understanding of Human Enterovirus D68. *Viruses*.2019.11(6);490 Available from: <https://doi.org/10.3390/v11060490>
43. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul AV, Wimmer E. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*.2014.78(3);418-37. Available from: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-14>
44. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, Van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol*.2018.16(6);368-381. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
45. Esposito S, Bosis S, Niesters H, Principi N. Enterovirus D68 Infection. *Viruses*.2015.7(11);6043-6050 Available from: <https://doi.org/10.3390/v7112925>
46. Oermann CM, Schuster JE, Connors GP, Newland JG, Selvarangan R, Jackson MA. Enterovirus D68: A Focused Review and Clinical Highlights from the 2014 U.S. Outbreak. *Ann Am Thorac Soc*.2015.12(5);775-781. Available from: <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201412-592FR>
47. Fatemi Y, Chakraborty R. Acute Flaccid Myelitis: A Clinical Overview for 2019. *Mayo Clin Proc*.2019.94(5);875-881 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.03.011>
48. Kramer R, Lina B, Shetty J. Acute flaccid myelitis caused by enterovirus D68: Case definitions for use in clinical practice. *Eur J Paediatr Neurol*.2019.23;235-239 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.01.001>
49. Hixon AM, Frost J, Rudy MJ, Messacar K, Clarke P, Tyler KL. Understanding Enterovirus D68-Induced Neurologic Disease: A Basic Science Review. *Viruses*. 2019.11(9);821 Available from: <https://doi.org/10.3390/v11090821>
50. Cruz-Rivera M, Forbi JC, Yamasaki LHT, Vazquez-Chacon CA, Martinez-Guarneros A, Carpio-Pedroza JC. et al. Molecular epidemiology of viral diseases in the era of next generation sequencing. *J Clin Virol*.2013.57(4);378-380. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.04.021>
51. Parreira R. Laboratory methods in molecular epidemiology: viral infections. *Microbiol Spectrum*.2018.6(6). Available from: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0003-2018>
52. Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*.1995.53 (1);25-36. Available from: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00173-E](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00173-E)
53. Livak, K. J., &Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*.2001.25(4);402-408. Available from: <https://doi:10.1006/meth.2001.1262>
54. Meo, S.A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., Ansari, M. J. Role of honey in modern medicine. *Saudi J Biol Sci*.2017.(24);975-978. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>

55. Md. Zakerin Abedin⁶, and Md. Ekhlash Uddin^{7*}A. S. M. S. S. M. M. R. H. M. A. S. I. R. I. M. S. A. M. H. M. “ANTICIPATION OF NATURAL HONEY IN FIGHTING AGAINST NOVEL CORONAVIRUS: PHARMACOLOGIC AND THERAPEUTICAL STUDY ”. J Nat Med.2020.21.8(1);142-9. Available from: <https://www.jnronline.com/ojs/index.php/about/article/view/544>
56. Hossain K., Hossain M., Moni A., Rahman Md. M., Rahman U. H., et al. Prospects of honey in fighting against COVID-19: pharmacological insights and therapeutic promises.Heliyon. 2020.6(12)Availablefrom:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05798>
57. Elrick MJ., Pekosz A., Duggal P. Enterovirus D68 Molecular and CellularBiology, and Pathogenesis.JBiolChem.2021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100317>
58. Hu Y., Musharrafieh R., Zheng M., Wang J. Enterovirus D68 Antivirals: Past, Present, and Future.ACS Infect Dis.2020.6(7);1572-1586. Available from:<https://doi:10.1021/acsinfecdis.0c00120>