



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΪΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ ΕΝΑΝΤΙ
ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥ D68.**

ΜΠΑΤΑΛΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ-ΠΑΥΛΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

Διερεύνηση αντιϊκής δράσης του Μελισσόψωμου έναντι του
Εντεροϊού D68.

Study of antiviral activity of beebread against Enterovirus D68.

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημητρίου. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση της παρούσας εργασίας καθώς και για την καθοδήγηση που μου παρείχε όσον αφορά την εκπόνηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοπληροφορικής για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Η ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την βοήθεια και καθοδήγηση του μέλους Ε.ΔΙ.Π. Δημητρίου Τηλέμαχου, στον οποίο και οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ. Οι χρήσιμες συμβουλές και η στήριξη του ήταν καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση του συγκεκριμένου πειράματος.

Επιπλέον υπήρξε πολύτιμη βοήθεια του κ. Ασούτη, Διδαρά Νικόλαου, Υποψήφιου Διδάκτορα για την απομόνωση και παροχή των δειγμάτων μελισσόψωμου στην παρούσα ερευνητική εργασία καθώς επίσης η στήριξη και συνεργασία όλου του υπόλοιπου εργαστηρίου.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την οικονομική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μελισσόψωμο αποτελεί ένα μοναδικό προϊόν για τον άνθρωπο και τις μέλισσες καθώς παράγεται από γύρη, μέλι και εκκρίσεις σιελογόνων αδένων των μελισσών και τελικώς υποβάλλεται σε γαλακτική ζύμωση από βακτήρια και ζύμες. Είναι ευρέως διαδεδομένο για τις αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριδιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες που προσφέρει ως προϊόν της κυψέλης. Η μελέτη της αντιϊκής του δράσης βρίσκεται ακόμη σε πρώιμα στάδια μελέτης εάν και έχει αποδειχθεί έως ενός βαθμού. Στην παρούσα ερευνητική εργασία στόχο αποτέλεσε η διερεύνηση της αντιϊκής και κυτταροτοξικής δράσης 18 διαφορετικών δειγμάτων μελισσόψωμου έναντι του Εντεροϊού D68 *in vitro*, σε καλλιέργειες επιστρωμένες με κύτταρα RD. Ο συγκεκριμένος ιός είναι υπεύθυνος για ήπιες έως και σοβαρές ασθένειες της αναπνευστικής οδού και μολύνει κυρίως παιδιά προκαλώντας συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη μεταδίδεται κυρίως μέσω αεραγωγών της αναπνευστικής οδού. Τα επιδημιολογικά φαινόμενα που έχουν ξεσπάσει τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς και η απουσία εγκεκριμένης φαρμακευτικής αγωγής για την θεραπεία λοιμώξεων από τον EV-D68 στρέφουν τις έρευνες στην αναζήτηση εναλλακτικών θεραπειών. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 και 0,125mg/ml, στα 18 δείγματα μελισσόψωμου για την μέτρηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι του EV-D68. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση της κυτταροτοξικής και αντιϊκής δράσης σε κάθε δείγμα μελισσόψωμου σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Οι συγκεντρώσεις που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη προστατευτική δράση έναντι του ιού απομονώθηκαν, εκχυλίστηκε το ιϊκό του RNA, μέσω της RT-PCR και της αντίστροφης μεταγραφής μετατράπηκε σε cDNA και τελικώς ενισχύθηκε η 5'-UTR περιοχή του με Real-Time PCR. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR οδήγησε στον υπολογισμό της τιμής IC₅₀ για κάθε δείγμα μελισσόψωμου και τον προσδιορισμό της αντιϊκής του δράσης έναντι του συγκεκριμένου ιού. Η τιμή CC₅₀ που σχετίζεται με την κυτταροτοξικότητα κάθε δείγματος μετρήθηκε με την βοήθεια της μεθόδου MTT καθώς και το Selectivity Index το οποίο αποδόθηκε ως ο λόγος CC₅₀/IC₅₀ αποτέλεσε τον καταλυτικό παράγοντα για τον τελικό χαρακτηρισμό της αντιϊκής δράσης κάθε δείγματος

μελισσόψωμου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη και με βάση τις τιμές CC_{50} και IC_{50} το δείγμα 1 το οποίο και προέρχεται από την περιοχή Σωτηρίτσας Λαρίσης εμφάνισε την ισχυρότερη αντιϊκή δράση με $SI=98.542$, όπως επίσης και τα δείγματα 4 και 15 προερχόμενα από την Αγία Λαρίσης και την Πελοπόννησο αντίστοιχα, συγκρινόμενα με τις γύρες 1 και 2, ενθαρρύνοντας τελικώς την περαιτέρω μελέτης τους.

ABSTRACT

Bee bread is a unique product for humans and bees as it is produced from pollen, honey and salivary secretions of bees and is finally subjected to lactic fermentation by bacteria and yeasts. It is widely used for its antioxidant, antibacterial and anti-cancer properties. The study of its antiviral activity is still under investigation although it has been proven to some extent. In the present study, the aim was to investigate and study the antiviral and cytotoxic activity of 18 different bee bread samples against Enterovirus D68 in vitro, in cultures coated with RD cells. EV-D68 is responsible for mild to severe respiratory diseases and mainly infects children causing flu-like symptoms transmitted mainly through the airways of the respiratory tract. Epidemiological phenomena that have erupted in recent decades, as well as the lack of approved medication to treat infections by EV-D68, are driving research into the search for alternative therapies. In this study, concentrations of 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 and 0.125 mg / ml were used in 18 bee bread samples to measure their inhibitory effect against EV-D68. Initially, microscopic observation of cytotoxic and antiviral activity was performed on each bee bread sample in 96-well plates. The concentrations with the greatest protective effect against the virus were isolated, the viral RNA was extracted, reverse transcribed to cDNA, and finally its 5'-UTR region was amplified by Real-Time PCR. Analysis of qPCR results led to the calculation of the IC₅₀ value for each sample of bee bread and the determination of its antiviral activity against the specific virus. The CC₅₀ value related to the cytotoxicity of each sample was measured using the MTT assay and the Selectivity Index which was rendered as the CC₅₀ / IC₅₀ ratio was the catalyst for the final characterization of the antiviral activity of each bee bread sample. According to the results obtained in the present study, based on the CC₅₀ and IC₅₀ values, sample 1, which comes from the Sotiritsa area of Larissa, showed the strongest antiviral activity with SI = 98,542 , as well as samples 4 and 15 from Agia Larissa and the Peloponnese respectively, compared to pollen samples 1 and 2 , finally encouraging their further study.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

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

Τ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ:

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (Ε.ΔΙ.Π.) , ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο; (BB)	9
1.2Σύσταση του μελισσόψωμου (BB)	10
1.2.1 Βιοχημικές αλλαγές για την μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο.....	11
1.3 Αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση του μελισσόψωμου.....	14
1.4 Εντεροϊός D68	15
1.4.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών	16
1.4.2 Δομή των ιικών σωματιδίων.....	17
1.4.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος.....	18
1.5 Κύκλος ζωής του ιού	20
1.6 Παθογένεια του ιού.....	22
1.7 Επιδημιολογία	23
2.ΣΚΟΠΟΣ.....	26
3.ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ.....	27
3.1 Δείγματα και συλλογή μελισσόψωμου (beebread)	27
3.2 Πειραματικό Στέλεχος Εντεροϊού.....	28
3.3 Κυτταροκαλλιέργειες.....	28
3.4 Καλλιέργεια ιών και μέτρηση του ιικού τίτλου.....	29
3.5.Προετοιμασία αραιώσεων δειγμάτων μελισσόψωμου.....	30
3.6 MTT ASSAY	31
3.7 Υπολογισμός τιμής CC ₅₀	32
3.8 Ενοφθαλμισμός του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες παρουσία των δειγμάτων μελισσόψωμου και παράλληλος έλεγχος αντι-ϊικής δράσης των δειγμάτων.	33
3.9 Εκχύλιση ιικού RNA	34
3.10 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT).....	35
3.11 Real-Time PCR.....	36
3.12 Υπολογισμός της τιμής IC ₅₀	37
3.13 Selectivity Index	39
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
4.1 Υπολογισμός CC ₅₀	40
4.2 Υπολογισμός IC ₅₀	41
4.3 Υπολογισμός Selectivity Index.....	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο; (BB)

Τα προϊόντα που παράγονται από την μέλισσα (όπως το μέλι, η γύρη, **το μελισσόψωμο**, ο βασιλικός πολτός, η πρόπολη και η κερύθρα) χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα ως παραδοσιακές θεραπείες. Σήμερα παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα προϊόντα, όσον αφορά τη βιοδραστικότητα τους και την εφαρμογή τους στην εναλλακτική ιατρική και την μελισσοθεραπεία (Didaras et al., 2020). Τα προϊόντα που παράγονται από την μέλισσα είναι ζωτικής σημασίας τόσο για την επιβίωση τους όσο και για ιατρικούς λόγους, εφαρμογές κοσμετολογίας και καθημερινές χρήσεις από το 8000 π.Χ (Mohammad et al., 2021).

Το μελισσόψωμο είναι ένα μοναδικό προϊόν για τον άνθρωπο και τις μέλισσες που παράγεται από γύρη, μέλι και εκκρίσεις σιελογόνων αδένων των μελισσών, το οποίο εναποτίθεται από τις μέλισσες στην κυψέλη καλυμμένο από κεριά και μέλι (Dranca et al., 2020, ; Barajas et al., 2012). Το πρόδρομο μείγμα, κατά τη διάρκεια της διατήρησης του στην κυψέλη, υποβάλλεται σε γαλακτική ζύμωση η οποία προκαλείται από βακτήρια και ζύμες, με αποτέλεσμα να προκύψει ως τελικό προϊόν το μελισσόψωμο, το οποίο έχει μια καφέ-καραμελένια απόχρωση και μια αίσθηση γεύσης που αποδίδεται στα εσπεριδοειδή, και τα διάφορα λουλούδια (Khalifa et al., 2020, ; Dranca et al., 2020, ; Anderson et al., 2014).

Το μελισσόψωμο αποτελεί την κύρια τροφή για την κυψέλη και ιδίως για τις προνύμφες και τις νεαρές μέλισσες-εργάτριες που παράγουν βασιλικό πολτό (Kieliszek et al., 2018). Μπορεί να θεωρηθεί σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι βιταμίνες (C, B, K, P και E) και οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα) τα οποία επηρεάζονται από την πηγή γύρης και από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του φυτού(γεωγραφική προέλευση, έδαφος, κλίμα) (Bakour et al., 2019, ; Zuluaga et al., 2015).

Παρά τον ρόλο του BB ως κύρια πηγή πρωτεϊνών για τις μέλισσες, έχουν αποδειχθεί μέσα από σειρές μελετών οι αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές του ιδιότητες (Sobral et al., 2017).

1.2 Σύσταση του μελισσόψωμου (BB)

Η σύσταση του BB ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση της γύρης αλλά αποτελείται κυρίως από νερό, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, ανόργανα στοιχεία και διάφορα άλλα δευτερεύοντα συστατικά όπως δεκανοϊκό οξύ, γάμμα γλοβουλίνη, νουκλεϊκά οξέα, βιταμίνες B και C, παντοθενικό οξύ, βιοτερίνη, νεοπτερίνη, ακετυλοχολίνη και ορμόνες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή (Giroud et al., 2013).

Η θρεπτική αξία του μελισσόψωμου ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες όπως η βοτανική προέλευση, η γεωγραφική θέση, οι κλιματολογικές συνθήκες, ο τύπος εδάφους, δραστηριότητες μελισσοκόμων, καθώς και στα είδη μελισσών συμβάλλουν στη χημική του σύνθεση (Feas et al., 2012).

Η «πρώτη ύλη» του μελισσόψωμου προέρχεται από τη γύρη των φυτών. Η γύρη αποτελείται από γύρες λεπτές κοκκώδεις ουσίες που παράγονται από τον ανθήρα του φυτού και περιέχουν αρσενικά γαμετόφυτα (σπερματοζωάρια), απαραίτητα για την αναπαραγωγή των φυτών. Διανέμεται είτε μέσω του ανέμου («anemophilous» - που επικονιάζεται από τον αέρα) ή από ένα έντομο («entomophilous» - επικονιασμένο με έντομα) (Kieliszek et al., 2018).

Αναλυτικότερα, η μέλισσα μπορεί να έχει ένα μέσο εύρος πτήσης εντός ακτίνας 712 m το οποίο βέβαια ποικίλλει ανάλογα με τα είδη των μελισσών, το μέγεθος του σώματος τους και τη διαθεσιμότητα των τροφών (Mohammad et al., 2020).

Κατά τη διάρκεια της συλλογής τροφής, οι μέλισσες συλλέγουν το νέκταρ από τα διάφορα φυτά και το αποθηκεύουν στο στομάχι τους καθώς τα σώματά τους καλύπτονται από σκόνη γύρης (Lob et al., 2017).

Καθώς οι μέλισσες συλλέγουν γύρη, χρησιμοποιούν ένζυμα των σιελογόνων αδένων όπως η αμυλάση και η γλυκοσιδάση, καθώς και μέλι ώστε να υγροποιηθεί και να «συσκευαστεί» η γύρη στα πίσω πόδια τους. Η προσθήκη

αυτών των ουσιών μετατρέπει τη γύρη των λουλουδιών σε γύρη της μέλισσα (beepollen) (Campos et al., 2008). Οι μέλισσες στην συνέχεια μεταφέρουν τη συλλεχθείσα γύρη (γύρη μελισσών) με το νέκταρ στη δική τους κυψέλη.

Οι εργάτριες μέλισσες στην συνέχεια συσκευάζουν τη γύρη μελισσών μέσα σε κευροειδή κύτταρα αποτελούμενα από κερί μέλισσας και ρητίνη. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης της γύρης επιτελείται μια βακτηριακή ζύμωση γαλακτικού οξέος ώστε να μετατραπεί η γύρη των μελισσών σε μελισσόψωμο (Beebread), (Ivanišová et al., 2015).

1.2.1 Βιοχημικές αλλαγές για την μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο.

Η γύρη των λουλουδιών διέρχεται από διαφορετικά στάδια επεξεργασίας ώστε να παραχθεί ως τελικό προϊόν το μελισσόψωμο. Ίσως η πιο αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ της γύρης των μελισσών και του μελισσόψωμου είναι το pH καθώς το BB είναι πιο όξινο σε σύγκριση με τη γύρη (Degrandi-Hoffman et al., 2013).

Επιπλέον η ζύμωση που επιτελείται για την παραγωγή του μελισσόψωμου δεν προκαλεί μόνο χημικές αλλαγές, αλλά και εικάζεται ότι μπορεί να βελτιώσει την ευπεψία και βιοδιαθεσιμότητα του καθώς ελαχιστοποιούνται τα εξωτερικά στρώματα της γύρης (Urcan et al. 2017).

Το μελισσόψωμο έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία η οποία αποδίδεται στις ιδιότητες της γύρης που προσελκύουν νερό από το περιβάλλον. Συσσωρεύοντας νερό από το περιβάλλον και μέσω της προσθήκης σάλιου από την μέλισσα προκύπτει τελικά ένα κολλώδες προϊόν. Η αποθήκευση του σε κλειστά δοχεία αποτρέπει την απώλεια νερού από το μελισσόψωμο (Alves et al., 2018).

- **Πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα**

Η περιεκτικότητα του BB θεωρείται πλούσια σε πρωτεΐνες. Σύμφωνα με την URCAN et al. 2017 η τιμή αυτή κυμαίνεται μεταξύ 14,1 έως 37,3g / 100g (ξηρή

βάση) που αξιολογείται χρησιμοποιώντας τον παράγοντα $N \times 6,25$, έχοντας μια μέση μέση τιμή $23,1 (\pm 2,9) \text{ g} / 100 \text{ g}$. Αναμένεται ότι η περιεκτικότητα του BB σε πρωτεΐνες είναι παρόμοια με τη γύρη των μελισσών (περίπου $23,8 \text{ g} / 100 \text{ g}$) (Fuenmayor et al., 2014), δεδομένου ότι οι βιοχημικές διεργασίες που επιτελούνται από τις μέλισσες στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση του εξωτερικού στρώματος της γύρης, χωρίς την καταστροφή του εσωτερικού περιεχομένου (Zuluaga et al., 2015).

Τα ένζυμα που εντοπίζονται στο BB περιλαμβάνουν την αμυλάση, την φωσφατάση και την γλυκοξειδάση (Salazar González et al., 2016). Το BB περιέχει επίσης αμινοξέα όπως το γλουταμινικό οξύ, το ασπαρτικό οξύ, η προλίνη που βρίσκεται στην μεγαλύτερη ποσότητα, η αργινίνη, η βαλίνη, η ιστιδίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, αλανίνη, γλυκίνη και σερίνη (Bereñe et al., 2015). Η παρουσία της προλίνης και του γλουταμινικού οξέος σχετίζονται με την ποιότητα της γύρης των μελισσών. Συγκέντρωση γλουταμινικό οξύ μεγαλύτερη από 20 mg/g υποδηλώνει «φρεσκάδα», ενώ η χαμηλότερη τιμή προλίνης δείχνει ότι το προϊόν έχει υποστεί επεξεργασία (Dominguez Valhondo et al., 2011)

- **Λιπίδια**

Η περιεκτικότητα των λιπιδίων στο ακατέργαστο BB ποικίλλει ευρέως ανάλογα με την φυτική προέλευση της γύρης από την οποία και παράγεται. Τα λιπίδια αποτελούνται από λιπαρά οξέα τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην βιολογική αξία αυτού του προϊόντος. Τα λιπαρά οξέα είναι ενώσεις υψηλής σημασίας γονιμότητα και υγεία των μελισσών.

Ο Čeksterytė et al., (2008) εντόπισε είκοσι δύο λιπαρά οξέα στο BB που συλλέχθηκαν κατά την περίοδο της άνοιξης και του καλοκαιριού, συμπεριλαμβανομένων πέντε ω -3, τεσσάρων ω -6 και τριών ω -9 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Το οκταδεκανοϊκό και το εικοσα-τετραενοϊκό οξύ ήταν τα πιο άφθονα ακόρεστα λιπαρά οξέα στην συγκεκριμένη μελέτη, αποτελώντας περίπου το 15% ολικών λιπαρών οξέων. (Urcan et al. 2017).

Σε μια άλλη μελέτη, οι Čeksterytė και Jansen το 2012 ανέφεραν το υψηλότερο περιεχόμενο (27–43,8%) του οκταδεκατενοϊκού οξέος (ω -3) μεταξύ των 22 λιπαρών οξέων. (Čeksterytė et al., 2012). Το BB είναι μια καλή πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη διατροφή. Τα PUFAs δεν μπορούν να συντεθούν στο ανθρώπινο οργανισμό ενδογενώς και έτσι είναι απαραίτητο να προλαμβάνονται από τις τροφές (Čeksterytė et al., 2008). Από αυτή την άποψη, το BB μπορεί να ληφθεί υπόψη ως πιθανή πηγή PUFAs στην ανθρώπινη διατροφή, ωστόσο το συγκεκριμένο ζήτημα είναι ακόμη υπό εξέταση (Muammer et al., 2016).

- **Υδατάνθρακες**

Η περιεκτικότητα του BB σε υδατάνθρακες ποικίλλει και αυτή σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την προέλευση της γύρης. Σύμφωνα με τις χημικές αναλύσεις μπορούμε μία μέση τιμή περιεκτικότητας του BB σε υδατάνθρακες είναι μεταξύ 24,40 - 34,80%(Berene et al., 2015).

Η φρουκτόζη εντοπίζεται στη μεγαλύτερη ποσότητα (57,51% του συνολικού βάρους), ακολουθούμενη από την γλυκόζη (42,59%) και την μαλτόζη (3,37%), (Stanciu et al., 2008). Η σακχαρόζη αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο 0,12% που προέρχεται από την υδρόλυση της σε μονοσακχαρίτες κατά τη γαλακτική ζύμωση της γύρης και τον τελικό μετασχηματισμό της σε BB. Οι εναπομείναντες δισακχαρίτες (τρεαλόζη, τουρανόζη και ισομαλτόζη) αντιπροσωπεύουν περίπου 1,82% του συνόλου βάρους του BB. Κατά την φυσική διαδικασία της ζύμωσης που διενεργείται στην κυψέλη, ο *Lactobacillus* sp., χρησιμοποιεί τους υδατάνθρακες ως πηγή οξυγόνου και παράγει γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 3,2%, ένα γεγονός που απενεργοποιεί τον ίδιο *Lactobacillus* sp. (Stanciu et al., 2008).

- **Μεταλλικά στοιχεία**

Λαμβάνοντας υπόψη τη χημική του σύνθεση, εκτός από τις αναφερόμενες ενώσεις, το BB περιλαμβάνει επίσης μέταλλα όπως Ca, Mg, P, Fe, Na, K, Al, Mn, S,

Cu (Anđelković et al., 2012). Η περιεκτικότητα του BB σε κάλιο εμφανίστηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση (0,74%) ακολουθούμενη από το ασβέστιο και τον φωσφόρο (0,65%). Ο σίδηρος βρέθηκε σε περιεκτικότητα (121,99 mg/kg) και ο ψευδάργυρος (44,09 mg/kg) σε υψηλά ποσοστά στο μελισσόψωμο (Stanciu et al., 2009). Σύμφωνα με μια μελέτη που έγινε από τον Anđelković, et al., (2012), ο οποίος σύγκρινε το BB με την γύρη των μελισσών, η περιεκτικότητα του μελισσόψωμου σε ασβέστιο, κάλιο, φωσφόρο, μαγνήσιο και σίδηρο ήταν αυξημένες σε σύγκριση με τη γύρη. Ωστόσο, ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο είχαν μικρότερη περιεκτικότητα στο BB. Αυτή η μείωση μπορεί να εξηγηθεί από την μικροβιακή δραστηριότητα και τις χημικές αντιδράσεις που διενεργούνται κατά την μετατροπή της γύρης στο μελισσόψωμο. (Anđelković et al., 2012).

Ωστόσο και άλλοι παράγοντες όπως οι γεωγραφικές συνθήκες και το έδαφος επηρεάζουν επίσης την περιεκτικότητα του BB σε μέταλλα (Urcan et al. 2017).

1.3 Αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση του μελισσόψωμου

Αυξημένο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πιθανά θεραπευτικά οφέλη του μελισσόψωμου, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του (Carpes et al., 2007, ; Morais et al., 2011, ; Basim et al., 2006). Φαίνεται να είναι αποτελεσματικό στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του (Pascoal et al., 2013, ; Audisio et al., 2005, ; Mutsaers et al., 2005). Θεωρείται ως μια φυσική, υγιεινή τροφή, πλούσια σε ενέργεια, η οποία παρέχει θρεπτικά συστατικά στον ανθρώπινο οργανισμό, με ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών ιδιοτήτων (Silva et al., 2006).

Σύμφωνα με την μελέτη του Abouda et al., (2011), ο οποίος μελέτησε την **αντιμικροβιακή δραστηριότητα** δειγμάτων μελισσόψωμου από διαφορετικές περιοχές του Μαρόκου σε διάφορα βακτηριακά στελέχη που σχετίζονται με την ανθρώπινη παθολογία συμπεριλαμβανομένων των *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Pseudomonas aeruginosa* προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: η ανάπτυξη των περισσότερων βακτηριακών στελεχών παρεμποδίστηκε από τις

αραιώσεις $\frac{1}{2}$ και $\frac{1}{4}$. Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι όλα τα δείγματα παρουσίαζαν έντονες αντιμικροβιακές δραστηριότητες στα διάφορα βακτηριακά στελέχη. Επιπλέον, τα Gram θετικά βακτήρια ήταν πιο ευαίσθητα στο μελισσόψωμο σε σύγκριση με τα Gram αρνητικά βακτήρια (Urcan et al. 2017, ; Abouda et al., 2011).

Το 2017 ο Sobral et al. μελέτησαν την **αντικαρκινική δραστηριότητα** του μελισσόψωμου το οποίο συλλέχθηκε από την βορειοανατολική Πορτογαλία έναντι σε διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως MCF-7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού), NCI-H460 (καρκίνος του πνεύμονα), HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας) και HepG2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), και επίσης έναντι μη καρκινικών ηπατικών κυττάρων (ηπατικά κύτταρα χοίρου, PLP2). Τα δείγματα παρουσίασαν μέτρια αντικαρκινική δράση, ωστόσο κανένα από αυτά δεν προκάλεσε τοξικότητα στα φυσιολογικά μη καρκινικά κύτταρα (Sobral et al., 2017).

1.4 Εντεροϊός D68

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί, όπως ο EV-D68, ανήκουν στο γένος *Enterovirus* και αποτελούν μέλη της οικογένειας Picornaviridae (Imamura et al., 2015). Ο εντεροϊός D68 ανακαλύφθηκε το 1962 αφού απομονώθηκε από κλινικά δείγματα παιδιών με πνευμονία στην Καλιφόρνια. Ο εντεροϊός D68 είναι non-polio εντεροϊός με βιολογικές και κλινικές ιδιότητες τόσο παρόμοιες με εκείνες των ανθρώπινων ρινοϊών που αρχικά ταξινομήθηκε ως ρινοϊός 87. Αναπτύσσεται σε βέλτιστη θερμοκρασία των 33°C και δεσμεύεται κυρίως σε υποδοχείς σιαλικού οξέος στην άνω και, λιγότερο συχνά, στην κάτω αναπνευστική οδό. Ο EV-D68 μεταδίδεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού και εντοπίζεται στα κλινικά δείγματα που λαμβάνονται από το αναπνευστικό σύστημα κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου (Messacar et al., 2018).

Τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae είναι ιοί χωρίς φάκελο και το γονιδιώμα τους είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA (ssRNA) το οποίο αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά (Lin JY

et al., 2009). Χαρακτηριστικό των μελών αυτού του γένους αποτελεί το μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών 4 πρωτεϊνών.

Στην οικογένεια των ιών αυτών περιλαμβάνονται και άλλοι παθογόνοι ιοί των ανθρώπων καθώς και των θηλαστικών όπως ο πολιοϊός (ιός της πολιομυελίτιδας), ο ιός της ηπατίτιδας Α, καθώς και ο ρινοϊός.

Η προέλευση του ονόματος της οικογένειας αυτών των ιών είναι σύνθετη, καθώς αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (pico), και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA) (Nikonov et al., 2017).

1.4.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών

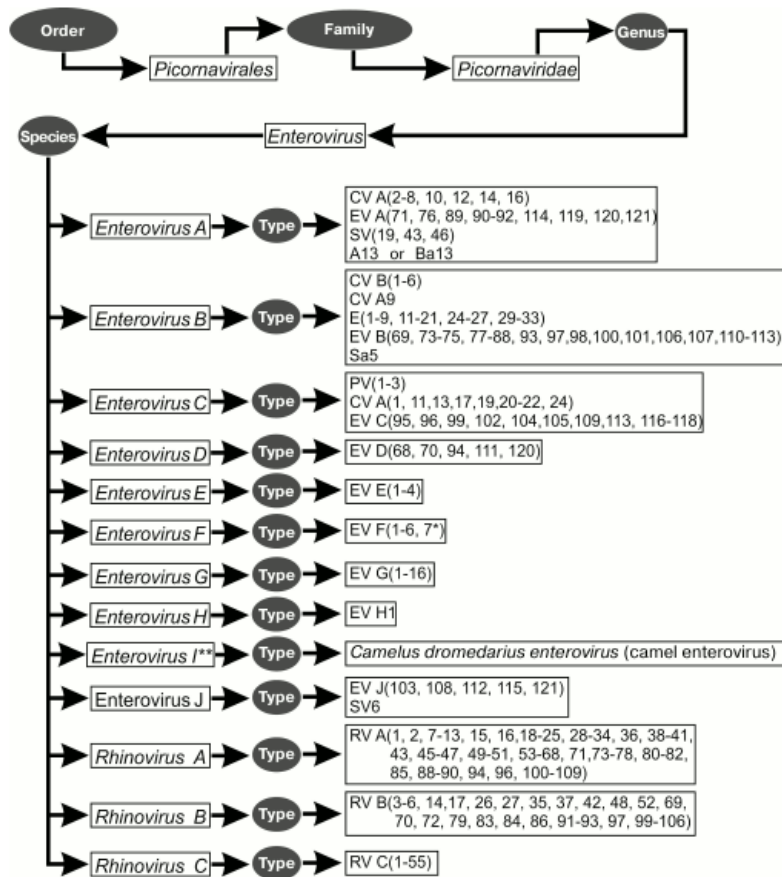
Η οικογένεια των ιών Picorna αποτελείται από σαράντα επτά είδη ιών: τα οποία παρατίθενται με αλφαβητική σειρά στον παρακάτω πίνακα (Adams M.J et al 2013).

Πίνακας 1.4.1: 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 το οποίο ανήκει στην οικογένεια Picorna ταξινομείται σε δώδεκα διακριτά γένη. Πιο συγκεκριμένα αποτελείται από εννέα γένη εντεροϊών (*Enterovirus A, B, C, D, E, F, G, H, and J*) και τρία γένη ρινοϊών (*Rhinovirus A, B,*

and C) (Nikonov et al., 2017). Ωστόσο το 2015 ανακαλύφθηκε ένα νέο είδος εντεροϊού στις καμήλες Enterovirus I. (εικόνα 1.4.1.1).



EIKONA 1.4.1.1 Τα είδη των εντεροϊών και οι ορότυποι τους (ICTV) (Nikonov et al., 2017)

1.4.2 Δομή των ιικών σωματιδίων

Τα ισωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά, εικοσαεδρικής συμμετρίας με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές υπομονάδες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή, οι οποίες αποτελούνται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4. (Modrow et al., 2013, ; Rueckert RR et al., 1969). Οι τέσσερις καψιδιακές πρωτεΐνες (VP1-VP4), που συγκροτούν το ισωμάτιο κωδικοποιούνται στην P1 περιοχή του γονιδιώματος και κάθε πρωτομερές συνίσταται από ένα αντίγραφο των

πρωτεϊνών αυτών. Οι VP1, VP2 και VP3 εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, σχηματίζοντας το κέλυφος ενώ η VP4 βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια. (Norikin LC et al., 2010).

Το εικοσαεδρικό καψίδιο έχει ως βασική μονάδα ένα πενταμερές το οποίο αποτελείται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4. Κατά την δημιουργία του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο. Τελευταίο στάδιο για την ωρίμανση του γενετικού υλικού και την σταθεροποίηση του ώριμου πλέον ιού αποτελεί η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 (Linden et al., 2015, ; Stanway et al., 2000).

Ο ιός στην εξωτερική του επιφάνεια απαρτίζεται από αυλακώσεις και προεξοχές. Η πιο χαρακτηριστική αυλάκωση (canyon) η οποία διατρέχει κάθε πενταμερή άξονα εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς κυττάρων καθώς συνδέεται με υποδοχείς της υπεροικογένειας ανοσοσφαιρινών με στόχο την διέγερση της απέκδυσης του ιού για την είσοδο του στο κύτταρο (Lin JY et al., 2009). Ωστόσο έχει προταθεί πως το canyon του EV-D68 είναι μικρότερο και πιο στενό από αυτό των υπόλοιπων εντεροϊών και ενδέχεται να μην χρησιμοποιεί του υποδοχείς αυτής της υπεροικογένειας (Liu Y et al., 2015).

1.4.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Όπως όλοι οι εντεροϊοί, ο EV-D68 ανήκει στην Ομάδα IV του συστήματος ταξινόμησης ιών κατά Baltimore με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Το γονιδίωμα του EV-D68 έχει μέγεθος περίπου 7,4kb και περιέχει τα ίδια στοιχεία με άλλα γονιδιώματα εντεροϊών, όπως μια 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR), ένα ενιαίο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, μια 3' αμετάφραστη περιοχή (UTR) και μία πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly-A) στο 3' άκρο του (Hixon et al., 2019).

Το θετικής (+) πολικότητας RNA του ιού είναι άμεσα μολυσματικό όταν απελευθερωθεί από το πρωτεϊνικό καψίδιο του. Χρησιμοποιώντας μια εσωτερική ριβοσωμική ακολουθία εισόδου (IRES) εντός του 5'UTR, το RNA του ιού εισβάλλει

στο ριβόσωμα του κυττάρου-ξενιστή για να ξεκινήσει άμεσα την μετάφραση των πρωτεϊνών του (Baggen et al., 2018).

Πιο συγκεκριμένα στο 5' άκρο της 5' UTR αμετάφραστης περιοχής υπάρχει μια συνδεδεμένη πρωτεΐνη VPg η οποία συμβάλλει στην σύνθεση του ιϊκού RNA, ωστόσο χάνεται σύντομα μέσα στο κύτταρο με αποτέλεσμα να μην εντοπίζεται στα περισσότερα ιϊκά μετάγραφα (Linden et al., 2015)

Μέσα στην πολυπρωτεΐνη υπάρχουν δύο πρωτεάσες, 2A και 3C, που τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη στα επιμέρους συστατικά της, τις πρωτεΐνες του καψιδίου P1, P2 και P3 και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες (Hixon et al., 2019).

Κάθε γονιδίωμα κωδικοποιεί επίσης μια από RNA εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση, η οποία λειτουργεί σε συνδυασμό με την ιική πρωτεΐνη 3B (VPg) για την αντιγραφή του RNA του ιού. Οι άλλες μη δομικές πρωτεΐνες έχουν σημαντικούς ρόλους στην προώθηση της αντιγραφής και στην αποδιοργάνωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (Baggen et al., 2018). Η P1 πρωτεΐνη αρχικά κόβεται στις επιμέρους της καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 ενώ οι P2 και P3 διασπώνται σε 7 μη δομικές πρωτεΐνες 2A-2C και 3A-3D.

- **5' μη κωδική περιοχή (5'UTR)**

Η 5'UTR αποτελεί μία υψηλά διατηρημένη δομή της μεταξύ των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών με μήκος περίπου 750 νουκλεοτιδίων, η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Η μεγάλη περιεκτικότητα της σε νουκλεοτίδια G-C, υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής η οποία έχει καθοριστικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού (Mahy BWJ et al., 2010). Περιλαμβάνει 7 ξεχωριστά δομικά στοιχεία (I-VII) και χωρίζεται σε περιοχές όπως: το cloverleaf (I) που επάγει τη σύνθεση του αρνητικού και θετικού κλώνου και στο IRES (Internal ribosome entry site) που επάγει την μετάφραση του ιϊκού γονιδιώματος και περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI (Wimmer et al., 1993).

- **Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)**

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης εντοπίζεται ανάμεσα στις περιοχές 5'UTR και 3'UTR και υπάρχουν τρεις διακριτές περιοχές P1, P2 και P3. Η περιοχή P1 κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ P2 και P3 κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την επεξεργασία και την αντιγραφή του γονιδιώματος (Kloc et al., 2018). Επιπλέον στην περιοχή που κωδικοποιεί την P1 εντοπίζεται και το γονίδιο VP1 το οποίο χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των ιών σε διαφορετικούς γονότυπους αλλά και ορότυπους καθώς εμφανίζει μεγάλη ποικιλία στο γονιδίωμα των εντεροϊών (Imamura et al., 2015).

- **3' μη κωδική περιοχή (3' UTR)**

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών έχει μέγεθος περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και είναι πιο μικρή σε σχέση με την 5'UTR, φέροντας και αυτή μια δευτεροταγή δομή, η οποία έχει ρόλο στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA (Jacobson et al., 1993). Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA, αποτελώντας το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Oberste et al., 2006). Ωστόσο, για τη μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ολόκληρης της 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών (Brown et al., 2005). Η παρουσία της πολυαδενυλιωμένης ουράς συμβάλλει στο σχηματισμό σταθερών RNA δευτεροταγών δομών με την 3'UTR και προστατεύει το ιικό RNA γονιδίωμα από την αποικοδομητική δράση ενδοκυτταρικών ενζύμων (Mahy BWJ et al., 2010).

1.5 Κύκλος ζωής του ιού

Η αντιγραφή των εντεροϊών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ως πρώτο βήμα στην διαδικασία αποτελεί η σύνδεση του ιού σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Για την απέκδυση του RNA στην συνέχεια ακολουθείται μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Κατά την

είσοδο του θετικής πολικότητας ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, ξεκινάει η μετάφραση ώστε τελικά να παραχθούν ιικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ιικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία στην συνέχεια τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Πρόσφατες μελέτες για τον EV-D68 έδειξαν πως συνδέεται με τις περιοχές canyon σε α 2,6 και α 2,3 συνδεδεμένα σιαλικά οξέα κυρίως που εντοπίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα της ανώτερης αναπνευστικής οδού (Elrick et al., 2021). Όπως και στους υπόλοιπους εντεροϊούς, η σύνδεση αυτή οδηγεί στην είσοδο του ιού μέσα στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης προκαλώντας αλλαγές στην διαμόρφωση του (Brandenburg et al., 2007). Η απέκδυση που ακολουθεί είναι αυτή που επιτρέπει και την απελευθέρωση του RNA γονιδιώματος στο κυτόπλασμα (Panjwani et al., 2014, ; Strauss et al., 2013). Το γονιδίωμα του EV-D68 ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας λειτουργεί ως mRNA το οποίο μεταφράζεται σε ένα μοναδικό πολυπεπτίδιο που υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία για να αποδώσει τις τέσσερες δομικές και επτά μη δομικές πρωτεΐνες. Η πολυπρωτεΐνη αυτή υφίσταται τεμαχισμό από τις 2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro} πρωτεάσες σε 10 πρωτεΐνες, τις καψιδιακές VP0, VP3 και VP1 και τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή 2AC και 3AD.

Η αντιγραφή του RNA πραγματοποιείται από την ιϊκή RNA εξαρτώμενη πολυμεράση RNA, 3Dpol. Δημιουργείται πρώτα ο αρνητικός κλώνος(-) ssRNA ο οποίος λειτουργεί ως μήτρα για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων του γονιδιωματικού θετικής πολικότητας (+)ssRNA.

Οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι θετικής πολικότητας, στην συνέχεια είτε εισέρχονται σε έναν νέο κύκλο μετάφρασης/αντιγραφής είτε εισέρχονται σε καψίδια για να παράγουν ιικά σωματίδια. Η δημιουργία ενός προκαψιδίου η οποία αποτελείται αντίγραφα των πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3 επιτελείται από τα νέα ιικά σωματίδια. Ένα ώριμο ιϊκό σωματίδιο δημιουργείται αφού το ιϊκό RNA επάγει τον τεμαχισμό της VP0 σε VP2 και VP4 το οποίο απελευθερώνεται στην συνέχεια μέσω λύσης του κυττάρου-ξενιστή (Wells et al., 2019, ; Baggen et al., 2018). Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου και η μετάφραση του ιϊκού RNA δεν μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα, πιθανώς επειδή τα ριβοσώματα και η RNA πολυμεράση δεν είναι ικανά να σαρώσουν το γενετικό υλικό του ιού σε αντίθετες κατευθύνσεις ταυτόχρονα (Barton et al., 1999).

1.6 Παθογένεια του ιού

Ο EV-D68 είναι υπεύθυνος για ήπιες έως και σοβαρές ασθένειες της αναπνευστικής οδού και μολύνει κυρίως παιδιά προκαλώντας συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη. Φέρει δύο μοναδικά χαρακτηριστικά που τον ξεχωρίζουν από άλλους εντεροϊούς. Πρώτον αντί να μεταδίδεται μέσω της κοπρανώδους οδού όπως πολλοί άλλοι εντεροϊοί (ιός πολιομυελίτιδας, echovirus, coxsackievirus), ο EV-D68 μεταδίδεται κυρίως μέσω αεραγωγών της αναπνευστικής οδού. Η επιστημονική μοριακή εξήγηση η οποία υποδεικνύει και τον φαινότυπο του EV-D68 είναι ότι ο συγκεκριμένος ιός είναι ασταθής σε όξινα περιβάλλοντα, επομένως δεν μπορεί και να επιβιώσει στο όξινο περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού. Έχει αποδειχθεί ότι το χαμηλό pH μπορεί να προκαλέσει έκδυση των ιικών καψιδίων του EV-D68 (Liu Y et al., 2018). Δεύτερον, ο EV-D68 προτιμά χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 33°C, ενώ άλλοι εντεροϊοί όπως ο ιός coxsackie προτιμούν τους 37°C (Yanmei et al., 2020).

Η σύνδεση του στα επιθηλιακά κύτταρα της βλεννογόνου επιφάνειας γίνεται αμέσως μετά την είσοδο του στην ανώτερη αναπνευστική οδό. Η εξάπλωση των ιικών σωματιδίων στην αρχή είναι τοπική και εν συνεχεία μεταφέρονται σε δευτερεύοντα όργανα-στόχους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (Esposito et al., 2017). Το χρονικό διάστημα επώασης του ιού μπορεί να διαρκέσει από τρεις έως έξι ημέρες (περίοδος επώασης) καθώς και η ικανότητα μετάδοσης υπολογίζεται στο χρονικό διάστημα λίγων ημερών πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων έως και τρεις εβδομάδες από την μόλυνση.

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται από την λοίμωξη με τον ιό EV-D68 είναι ο βήχας, το φτέρνισμα, η ρινόρροια, ο πυρετός, η δύσπνοια και πονόλαιμος αλλά και σοβαρότερα συμπτώματα όπως επιδείνωση του άσθματος καθώς πνευμονία (Esposito et al., 2017, ; Oermann et al., 2015).

Εκτός από τα αναπνευστικά και εμπύρετα συμπτώματά που προκαλεί ο συγκεκριμένος ιός, η λοίμωξη από EV-D68 αναφέρεται ότι έχει συσχέτιση με την οξεία χαλαρή μυελίτιδα (AFM), μια νευρολογική διαταραχή (Sun Jing et al., 2019).

Πιο συγκεκριμένα μεταξύ Αυγούστου και Δεκεμβρίου 2014 μαζί με την επιδημία του EV-D68 καταγράφηκαν στις ΗΠΑ, 120 περιπτώσεις AFM. Η συχνότητα εμφάνισης AFM στην Καλιφόρνια αυξήθηκε από το πλατό των 0,028

περιπτώσεων σε 0,16 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα κάθε χρόνο. Ο EV-D68 αποτελούσε τον κοινό ιό που εντοπίστηκε στα δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος από άτομα με AFM εκείνη την χρονική περίοδο (Sejvar et al., 2016). Από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο του 2016, ο αριθμός των επιβεβαιωμένων περιπτώσεων AFM αυξήθηκε δραματικά: 144 άτομα επιβεβαιώθηκαν ότι είχαν AFM, κατά την ίδια χρονική περίοδο έξαρσης των κρουσμάτων από τον EV-D68. Συμπερασματικά ο EV-D68 εξακολουθεί να είναι το κύριο παθογόνο που ανιχνεύεται σε δείγματα που λαμβάνονται από την αναπνευστική οδό από ασθενείς με AFM (Sun Jing et al., 2019, ; Zheng et al., 2019).

Η AFM χαρακτηρίζεται πλέον ως μια παγκόσμια ασθένεια, με εκατοντάδες κρούσματα που αναφέρθηκαν σε ολόκληρη την Ευρώπη, την Ασία, την Αυστραλία, την Αφρική, και την Βόρεια και Νότια Αμερική.

Επηρεάζει συχνότερα τα μικρά παιδιά και χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη μυϊκής αδυναμίας ενός ή περισσότερων άκρων. Η κλινική εικόνα της AFM φαίνεται να μιμείται το σύνδρομο Guillain - Barré (Vogt MR et al., 2020).

1.7 Επιδημιολογία

Ο EV-D68 ταχτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1962 στην Καλιφόρνια (ΗΠΑ) αφού απομονώθηκε από στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα τα οποία λήφθηκαν από τέσσερα διαφορετικά παιδιά που είχαν πνευμονία και βρογχιολίτιδα. Τα τέσσερα μεμονωμένα ιικά δείγματα που απομονώθηκαν από τα παιδιά αυτά ονομάστηκαν "Fermon", "Rhyne", "Franklin" και "Robinson" αντίστοιχα (Hixon et al., 2019, ; Schieble et al., 1967). Μέσω βασικών τεχνικών, ο "ιός Fermon" ο οποίος έως τότε χαρακτηριζόταν έτσι, ταυτοποιήθηκε ως ιός RNA που είχε βιολογικά και χημικά χαρακτηριστικά που συσχετιζόταν με τους εντεροϊούς. Οι μετέπειτα εξελίξεις στην μοριακή βιολογία και γενετική οδήγησαν στην επαναταξινόμηση του ιού αυτού στο είδος D και τον ορότυπο 68 (EV-D68) (Hixon et al., 2019, ; Oberste et al., 2004). Από την δεκαετία του 1970 έως και το 2005, ο EV-D68 ήταν μια σπάνια αιτία πρόκλησης αναπνευστικών νόσων, και η συνεχής παρακολούθηση του από το CDC National Enterovirus Surveillance

System (NESS) κατέγραψε μόνο 26 θετικά δείγματα EV-D68 κατά τη διάρκεια εκείνης της περιόδου (Khetsuriani et al., 2006).

Στις αρχές της δεκαετίας του 2000 μέσω περαιτέρω επιστημονική μελέτης ο EV-D68 αλληλουχήθηκε εκ νέου και επαναταξινομήθηκε από ρινοϊός 87 (HRV-87) σε EV-D68 (Hixon et al., 2019 ; Ishiko et al., 2002 ; Blomqvist S. et al., 2002).

Η απομόνωση και ανάλυση δεκαεπτά δειγμάτων EV-D68 (και πρώην HRV-87) απομονώσεων που πραγματοποιήθηκαν στο CDC έδειξε ότι το EV-D68 ήταν μοναδικός μεταξύ των εντεροϊών, καθώς δεν μεταδίδονταν μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και είχε βέλτιστη αναπαραγωγή σε ψυχρότερες θερμοκρασίες (33° C). Και τα 17 από τα κλινικά EV-D68τα δείγματα απομονώθηκαν από την αναπνευστική οδό, υποδηλώνοντας εξάπλωση του ιού μέσω της συγκεκριμένης οδού (Oergmann et al., 2015). Μέχρι το τέλος του 2012, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 699 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις EV-D68 παγκοσμίως, υποδηλώνοντας έτσι μια τεράστια αύξηση των μολύνσεων από τον συγκεκριμένο ιό σε σύγκριση με τα προηγούμενα τριάντα χρόνια (Holm-Hansen et al., 2016).

Το φθινόπωρο του 2014,στις ΗΠΑ παρατηρήθηκε απότομη αύξηση εισαγωγών στις παιδιατρικές κλινικές νοσοκομείων λόγω αναπνευστικών νόσων, με τον EV-D68 να αναγνωρίζεται ως η κύρια αίτια με 1.395 περιπτώσεις επιβεβαιωμένων λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, παράλληλα με την ραγδαία αύξηση της οξείας χαλαρής μυελίτιδας (AFM) από τον Αύγουστο του 2014 έως τον Ιανουάριο του 2015 από το CDC.(Midgley et al., 2015). Επιπλέον κρούσματα αναπνευστικής λοίμωξης από EV-D68 επιβεβαιώθηκαν επίσης στον Καναδά, την Ευρώπη, την Ασία και την Νότια Αμερική την ίδια χρονική περίοδο. Από το 2014 και μετά, υπήρξαν δεκάδες αναφορές διασποράς του EV-D68 παγκοσμίως με τον ιό να εμφανίζεται προς το τέλος του καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου με την πλειοψηφία των ασθενών να είναι παιδιά (Holm-Hansen et al., 2016).

Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν εγκεκριμένες θεραπείες για λοιμώξεις από τον EV-D68. Για την θεραπεία αναπνευστικών νοσημάτων παρέχεται υποστηρικτική φροντίδα, μαζί με την επιπλέον σταθεροποίηση της κατάστασης του άσθματος όπου είναι αναγκαίο. Ο βασικός άξονας της θεραπείας στο AFM είναι επίσης υποστηρικτικός, μαζί με την έναρξη εντατικών θεραπειών

αποκατάστασης (Melicosta et al., 2019). Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την έγκυρη ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού σε δείγματα για την αποφυγή ή τον έλεγχο μιας επιδημίας του.

Η ανάπτυξη γρήγορων Real-Time PCR τεστ για την ανίχνευση του ιϊκού RNA του EV-D68 από το CDC στις ΗΠΑ καθώς και η αλληλούχιση του γονιδίου των δομικών πρωτεϊνών VP4-VP2 ή της περιοχής VP1 αποτελούν μεθόδους για την διάγνωση του (Elrick et al., 2021, ; Xiang et al., 2016, ; Oermann et al., 2014).

2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της αντιϊκής δράσης διάφορων δειγμάτων μελισσόψωμου (BB) ανά την Ελλάδα έναντι του Εντεροϊού D68 σε κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος (RD).

Στο συγκεκριμένο πείραμα δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις μελισσόψωμου, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96θέσεων. Αρχικά μελετήθηκε η τοξικότητα των διάφορων δειγμάτων μελισσόψωμου και γύρης έναντι των κυττάρων RD και στην συνέχεια η δράση τους ως προς την ανάπτυξη του ιού. Για τον υπολογισμό των ιικών αντιγράφων στις διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων BB χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Real-Time PCR.

3.ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ

3.1 Δείγματα και συλλογή μελισσόψωμου (beebread)

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν δεκαοκτώ (18) διαφορετικά είδη μελισσόψωμου, καθώς και δύο (2) δείγματα γύρης προερχόμενα από διαφορετικές πηγές, διαφόρων περιοχών ανά την Ελλάδα. Τα συγκεκριμένα δείγματα αλλά και η γεωγραφική τους προέλευση παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1.1).

Η απομόνωση των δειγμάτων μελισσόψωμου έγινε απευθείας από τις κυψέλες χρησιμοποιώντας πλαστικούς σωλήνες ίσης διαμέτρου με τα κύτταρα της κυψέλης και στη συνέχεια κάθε δείγμα αφαιρέθηκε από το σωλήνα χρησιμοποιώντας ένα έμβολο. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία στην κατάψυξη στους -20° C.

Πίνακας 3.1.1

α/α	Περιοχή	Ανθοφορία
1	Λάρισα Σωτηρίτσα	Ποικίλης ανθοφορίας
2	Θεσσαλία	Ποικίλης ανθοφορίας
3	Πήλιο	Ποικίλης ανθοφορίας
4	Λάρισα Αγιά	Ποικίλης ανθοφορίας
5	Πήλιο	Ανθοφορία Κισσού
6	Θεσσαλία Κόζιακας βιολογικό	Ποικίλης ανθοφορίας
7	Ηράκλειο Τύλισος	Ποικίλης ανθοφορίας
8	Κοζάνη	Ποικίλης ανθοφορίας
9	Ρέθυμνο Μελιδόνι	Ποικίλης ανθοφορίας
10	Άρτα	Ποικίλης ανθοφορίας
11	Χανιά	Ποικίλης ανθοφορίας
12	Λάρισα Σωτηρίτσα	Ανθοφορία λαδανιάς
12Λ	Λάρισα Σωτηρίτσα	Ανθοφορία λαδανιάς
13	Λασιθι βιολογικό	Ποικίλης ανθοφορίας
14	Εύβοια	Ποικίλης ανθοφορίας
15	Πελοπ/σος	Ποικίλης ανθοφορίας
16	Χαλκιδική	Ποικίλης ανθοφορίας
17	Άθως	Ανθοφορία Καστανιάς
1 (ΓΥΡΗ)	Πήλιο	Ανθοφορία Κισσού
2 (ΓΥΡΗ)	Θεσσαλία Κόζιακας βιολογικό	Ποικίλης ανθοφορίας

3.2 Πειραματικό Στέλεχος Εντεροϊού

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό ιϊκό 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 Κυτταροκαλλιέργειες

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια και την απομόνωση του συγκεκριμένου στελέχους ιού είναι αυτή του ραβδομυοσαρκώματος (Rhabdomyosarcoma-Rd, CCL-136™, ATTC). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε καθέτου νηματικής ροής συσκευές επιπέδου βιοασφάλειας 2, υπό ασηπτικές (ή άσηπτες) συνθήκες καθώς και με την χρήση αποστειρωμένων υλικών.

Αρχικά η κυτταρική σειρά επωαζόταν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας 25cc στους 37 °C, παρουσία θρεπτικού υλικού D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 1X Antibiotic-Antimycotic (Biosera), 5% CO₂, και 10% βόειου ορού. Η παρατήρηση των κυττάρων γινόταν σε καθημερινή βάση με την βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου διέλευσης φωτός και εξεταζόταν η ποιότητα τους και το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας της πλαστικής φιάλης των κυτταροκαλλιεργειών. Στην φάση όπου τα κύτταρα είχαν καλύψει περίπου το 90% της επιφάνειας της μεμβράνης ακολουθούσε ο αναδιπλασιασμός τους. Στο συγκεκριμένο στάδιο της διαδικασίας αρχικά απορρίπτονταν το θρεπτικό μέσο D-MEM και εν συνεχεία ακολουθούσαν δύο πλύσεις με διάλυμα θρυψίνης - EDTA και επώαση των κυττάρων για 2-3 λεπτά στους 37 °C με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης κυτταροκαλλιεργειών. Έπειτα ακολουθούσε επαναδιαλυτοποίηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Growth medium, GM) με ταυτόχρονο πιπετάρισμα με σκοπό να απαλειφθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων που μπορεί να δημιουργήθηκαν. Τέλος το εναιώρημα των κυττάρων

μοιραζόταν ισόποσα σε τρεις νέες φιάλες κυτταροκαλλιέργειών και επωαζόταν εκ νέου στους 37 °C μέχρι την πραγματοποίηση του επόμενου αναδιπλασιασμού.

Στο στάδιο της μόλυνσης της κυτταρικής σειράς με τα ιϊκά στελέχη D68 γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (Growth medium, GM) με θρεπτικό μέσο διατήρησης (Maintenance medium, 40MM), με περιεκτικότητα 2% σε όρο ώστε να επιτύχουμε μια αργή ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς κατά την διάρκεια του ιϊκού πολλαπλασιασμού.

3.4 Καλλιέργεια ιών και μέτρηση του ιϊκού τίτλου

Στο στάδιο της καλλιέργειας του ιϊκού στελέχους D68 χρησιμοποιήθηκε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (96 well-plate). Σε κάθε θέση της πλάκας προστέθηκαν 100 μl κυττάρων ραβδομοσάρκωματος (Rd) με επακόλουθη την επώαση της στους 37 °C με στόχο της προσκόλληση τους στον πυθμένα της πλάκας. Ακολούθως την επόμενη μέρα προστέθηκαν 100 μl σε κάθε θέση της πλάκας από τις σειριακές αραιώσεις του ιού 10^{-1} έως 10^{-8} εκτός από την πρώτη στήλη που αποτελούσε και τον αρνητικό μας μάρτυρα . Μετά την επανατοποθέτηση εκ νέου της πλάκας στους 37 °C ακολουθούσε παρακολούθηση της καθημερινά με την βοήθεια του ανάστροφου μικροσκοπίου διέλευσης φωτός και καταγραφή των αποτελεσμάτων. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων της κυτταροπαθογόνου δράσης σταματούσε κατά την εμφάνιση αλλοιώσεων στις σειρές των αρνητικών μαρτύρων (cell control). Ο υπολογισμός του ιϊκού τίτλου έγινε με βάση με την τιμή CCID₅₀ που αφορά την ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας.

Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιϊκός τίτλος είναι ο εξής:

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

CCID: Cell Culture Infective Dose (μολυσματική δόση κυτταροκαλλιέργειας)

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

Μετά τον υπολογισμό πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις μέχρι τελικής συγκέντρωσης 10^2 CCID₅₀/ 0,1 ml. Η επιλογή του συγκεκριμένου ιϊκού τίτλου έγινε με βάση προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας, έτσι ώστε η συνολική καταστροφή των κυττάρων Rd να προκαλείται μετά το πέρας 48 ωρών από τη χρονική στιγμή του ενοφθαλμισμού του σε κύτταρα.

3.5. Προετοιμασία αραιώσεων δειγμάτων μελισσόψωμου.

Τα δείγματα μελισσόψωμου συλλέχθηκαν απευθείας από τις κυψέλες και αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία στους -20°C.

Ποσότητα δείγματος διαλύθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle (D-MEM, LM-D1113, Biosera, France) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 10,000 rcf και στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε μέσω του φίλτρου Branchia 0.22μm (Labbox Labware, S.L., Barcelona, Spain). Τα φιλτραρισμένα διαλύματα BB και γύρης αραιώθηκαν περαιτέρω για την απόκτηση των τελικών συγκεντρώσεων.

Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης τοποθετήθηκαν 3 διαφορετικά δείγματα μελισσόψωμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, για ορισμένη συγκέντρωση, κάθε δείγμα BB 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 ήταν των 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 και 0,125mg/ml. Οι αραιώσεις των δειγμάτων προετοιμάστηκαν ξεκινώντας από την μεγαλύτερη συγκέντρωση 16mg/ml η οποία αποτελούνταν από 1,6 gr μελισσόψωμου συμπληρώνοντας την φλάσκα έως τα 5ml με θρεπτικό μέσο. Ακολουθούσε ανάδευση μέσω vortex ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το μελισσόψωμο μέσα στο θρεπτικό μέσο D-MEM. Για την αμέσως μικρότερη συγκέντρωση 8mg/ml αφαιρούνταν συγκεκριμένος όγκος 500μl από την πρώτη φλάσκα και συμπληρώναμε με 500μl θρεπτικού μέσου.

Για την συγκέντρωση 4mg/ml αφαιρέθηκαν από την φλάσκα των 80mg/ml 500μl και προστέθηκαν σε αυτή συμπληρώνοντας εκ νέου με 500μl D-MEM. Το ίδιο μοτίβο ακολούθησε και για τις υπόλοιπες αραιώσεις έως ότου να φτάσουμε στο 0,125mg/ml.

3.6 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 αφυδρογονάσεις. 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 συγκεκριμένο πείραμα για μια πιο ακριβή προσέγγιση της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων μελισσόψωμου. Αρχικά έγινε επίστρωση μίας πλάκας μικροτιτλοποίησης 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 BB σε θρεπτικό μέσο MEM χωρίς προσθήκη FBS, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 και 0,125 mg/ml και να ακολουθήσει η επώαση. Πριν την επώαση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε μελισσόψωμου, γινόταν απόρριψη του θρεπτικού υλικού. Κατά τη διαδικασία αυτή, η στήλη 11 συμπληρωνόταν μόνο με θρεπτικό υλικό απουσία BB 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:

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

3.7 Υπολογισμός τιμής CC_{50}

Ο υπολογισμός της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%), σχετίζεται με τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας και ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία θα θανατώσει το ήμισυ (50%) των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη

κυτταροκαλλιέργεια. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη η τιμή CC_{50} υπολογίστηκε με βάση την μέθοδο MTT.

Συγκεκριμένα, με βάση τις παρατηρούμενες τιμές κάθε δείγματος BB στις διάφορες συγκεντρώσεις του σχηματίστηκε μια γραφική παράσταση στο Excel, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε BB (σε mg/ml) στην οποία παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί την κυτταροτοξική συγκέντρωση 50%, CC_{50} .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Πίνακας 3.8.1: Ενδεικτική απεικόνιση του τρόπου οργάνωσης της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

3.8 Ενοφθαλμισμός του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες παρουσία των δειγμάτων μελισσόψωμου και παράλληλος έλεγχος αντι-ϊικής δράσης των δειγμάτων.

Η μελέτη της αντι-ϊικής δράσης του εκάστοτε δείγματος ελεγχόταν παράλληλα με την κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων. Η μόλυνση με τον ιό D68 της κυτταρικής σειράς του ραβδομυοσάρκωματος (Rd) έγινε παράλληλα με τις διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων με σκοπό την μελέτη των δυο

παραμέτρων (αντι-ϊική δράση, κυτταροτοξικότητα) που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Αφού παρασκευάστηκαν οι συγκεντρώσεις με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο (16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 και 0,125mg/ml) προστέθηκε σε αυτές ισόποσος όγκος εναιωρήματος 10^2 CCID₅₀ του ιϊκού στελέχους D68. Πιο συγκεκριμένα 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 BB και ο ενοφθαλμισμός με τον ιό. Σε κάθε πλάκα, όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, οι 2 ακριανές στήλες (στήλη 1 και στήλη 12) χρησιμοποιούνταν ως αρνητικοί μάρτυρες (cell control, C.C.) οι οποίοι αποτελούνταν από επιστρωμένα κύτταρα και 200μl D-MEM σε κάθε πηγαδάκι. Μία στήλη (στήλη 11) 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 μελισσόψωμου, ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση πιθανής αναστολής της δράσης του. Για κάθε δείγμα μελισσόψωμου χρησιμοποιούνταν μία τριπλέτα στην οποία προστίθενται από 100μl δείγματος BB ορισμένης συγκέντρωσης και 100μl του ιού (honey-virus control, H.V.C.) για την εξέταση της αντιϊκής δράσης του εκάστοτε δείγματος.

3.9 Εκχύλιση ιϊκού RNA

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για την εκχύλιση του γενετικού υλικού του ιϊκού στελέχους D68 είναι αυτό της Casas και των συνεργατών της (Casas et al.,1995). Ειδικότερα, τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf των 2ml 300μl Lysis Buffer ως πρώτο βήμα, το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroylsacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate, στην συνέχεια 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από κάθε πηγαδάκι της πλάκας κυτταροκαλλιέργειας. Στην συνέχεια ακολούθησε vortex του μείγματος και επώαση του για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ως

επόμενο βήμα στην διαδικασία προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολούθησε ξανά vortex του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά αυτή τη φορά στον πάγο. Την επώαση ακολουθεί, η φυγοκέντρηση του μείγματος για 10 λεπτά στα 14000g και η απομάκρυνση του υπερκειμένου.

Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και επιπλέον φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τελικό βήμα αποτέλεσε η απομάκρυνση του υπερκειμένου και η επαναδιαλυτοποίηση σε 100μl ddH₂O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση έως ότου ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

3.10 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)

Εφόσον ο συγκεκριμένος ιός έχει ως γενετικό υλικό RNA η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RNA μετατρέπεται σε cDNA) είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.

Ως πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η παρασκευή μείγματος το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1μl UC53 primer(100pmol/μl), 1μl 40mM dNTPs και ddH₂O (5μl/tube).

Σε eppendorfs των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μείγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο). Στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, τα eppendorfs τοποθετήθηκαν στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μείγμα το οποίο συμπεριλάμβανε για κάθε αντίδραση 0,01M DTT, 1X ρυθμιστικού διαλύματος Fast Gene Buffer, 100U ενζύμου Fast Gene Scriptase και ddH₂O ως τελικού όγκου των 8μl για κάθε αντίδραση. Μετά την προσθήκη 8μl του δεύτερου μείγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε σύντομη φυγοκέντρηση και στην συνέχεια επώαση σε 3 διαφορετικές συνθήκες 10 λεπτά στους 25°C, 50 λεπτά στους 42°C και 15 λεπτά στους 70°C.

UC53: 5' – TTGTCACCATAACCAGCCA – 3'

3.11 Real-Time PCR

Η συγκεκριμένη τεχνική της Real-Time PCR ναι μεν βασίζεται στην κλασσική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ωστόσο παρακολουθεί την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA (που προέκυψε από την αντίστροφη μεταγραφή) σε πραγματικό χρόνο με την χρήση μιας φθορίζουσας χρωστικής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζουσα χρωστική η SYBR Green, η οποία προσδένεται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA, απορροφώντας στα 497nm και φθορίζοντας στα 520nm. Το Amplification Plot αποτελεί ένα σχεδιάγραμμα απεικόνισης για την μέτρηση του φθορισμού, η οποία πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, το οποίο βοηθάει στην ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα το σχεδιάγραμμα αυτό αναπαριστά 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.

Αναλυτικότερα η 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 και δηλαδή τόσο πιο νωρίς θα ξεπερνάει το κατώφλι η ανιχνεύσιμη ποσότητα.

Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπει η SYBR Green είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ωστόσο, η συγκεκριμένη χρωστική προσδένεται μη ειδικά σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA (όπως είναι τα διμερή εκκινητών είτε τα παραπροϊόντα), επομένως θα πρέπει να γίνεται και μελέτη της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR στο τέλος της αντίδρασης μέσω της οποίας μπορεί να παρατηρηθεί εάν ενισχύθηκαν τα επιθυμητά προϊόντα. Συμπερασματικά μέσω της καμπύλης τήξης (Melting Curve ή Dissociation Curve) μπορεί να καταγραφεί η 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). Κάθε προϊόν έχει διαφορετική θερμοκρασία αποδιάταξης. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος και τη σύσταση του τμήματος DNA το οποίο ενισχύεται.

Συνεπώς αναμένεται 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. Σε περίπτωση που υπάρξει επιμόλυνση ή παρουσία παραπροϊόντων θα εντοπίζονται στην καμπύλη επιπλέον κορυφές οι οποίες όμως αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m). Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συγκριτικής Real-Time PCR κατά την οποία ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το virus control (V.C). Με σύγκριση της τιμής Ct του virus control με τις τιμές Ct των δειγμάτων προέκυψε τελικά 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 (Monroehoe et al., 2000). Αναλυτικότερα, 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)

3.12 Υπολογισμός της τιμής IC_{50}

Η τιμή IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή κατά το ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου *in vitro*. Ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} στο συγκεκριμένο πείραμα μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τη μικρότερη συγκέντρωση κάθε μελισσόψωμου, στην οποία αναστέλλεται κατά 50% το σύνολο των ιικών αντιγράφων. Με βάση τα αποτελέσματα της qPCR για

την αντιϊκή δράση του μελισσόψωμου, 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 μελισσόψωμο.

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 C_t (Cycle threshold) στα αποτελέσματα της qPCR. Αντίθετα, τα υπό μελέτη δείγματα αναμένεται να έχουν χαμηλότερο αριθμό ιϊκών αντιγράφων λόγω της ανασταλτικής δράσης του εκάστοτε δείγματος BB, δηλαδή υψηλότερες τιμές C_t σε σχέση με του θετικού μάρτυρα (V.C.).

Αρχικά, υπολογίζεται η διαφορά του C_t κάθε υπό μελέτη δείγματος από το C_t 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 BB 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 μελισσόψωμου, θα εφαρμόσουμε τον ακόλουθο τύπο: $1 - 2^{-\Delta Ct}$.

Οι τιμές που θα προκύψουν από αυτόν τον τύπο και οι συγκεντρώσεις του BB που χρησιμοποιήθηκαν μας δίνουν στο Excel την γραφική παράσταση από την εξίσωση της οποίας θα υπολογιστούν οι τιμές IC_{50} των δειγμάτων.

3.13 Selectivity Index

Για να προσδιοριστεί η αντιϊκή εκλεκτικότητα των δειγμάτων του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης επιλεκτικότητας (SI), ο οποίος καθορίζει την εξειδίκευση του ιού ως προς το κάθε δείγμα έναντι κυτταρικής καταστροφής που προκαλείται από ιό και υπολογίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$SI = CC_{50} / IC_{50}$$

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Υπολογισμός CC₅₀

Για την εκτίμηση των επιπέδων κυτταροτοξικής δράσης κάθε δείγματος μελισσόψωμου είναι απαραίτητος ο υπολογισμός της τιμής CC₅₀ για κάθε δείγμα, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία το 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια καταστρέφεται. 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 δείγμα μελισσόψωμου, οδήγησε στις τιμές CC₅₀ που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

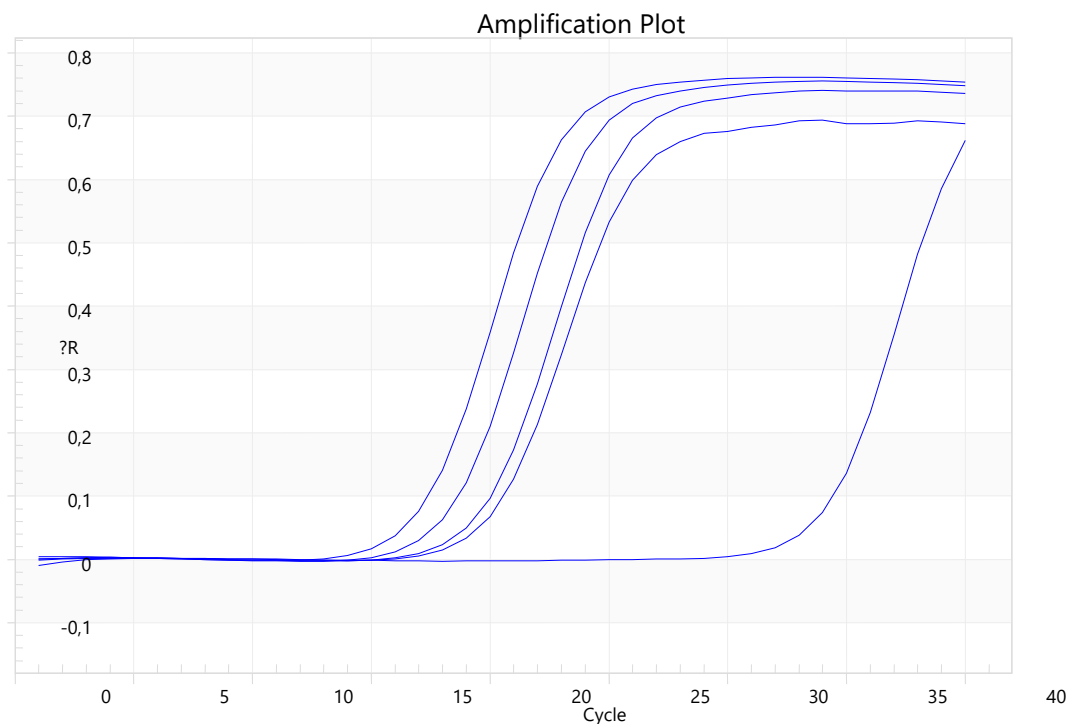
	Sample	(mg/ml) CC ₅₀
Beebread	1	4.73 ± 0.02
	2	2.32 ± 0.17
	3	0.23 ± 0.4
	4	8.60 ± 0.04
	5	6.83 ± 0.09
	6	0.17 ± 0.03
	7	1.28 ± 0.06
	8	0.63 ± 0.02
	9	0.31 ± 0.02
	10	5.25 ± 0.07
	11	3.78 ± 0.02
	12	1.03 ± 0.05
	12Λ	0.52 ± 0.02
	13	3.87 ± 0.04
	14	4.15 ± 0.06
	15	7.56 ± 0.02
	16	8.03 ± 0.01
Γύρη	1	4.85 ± 0.01
	2	10.19 ± 0.02

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

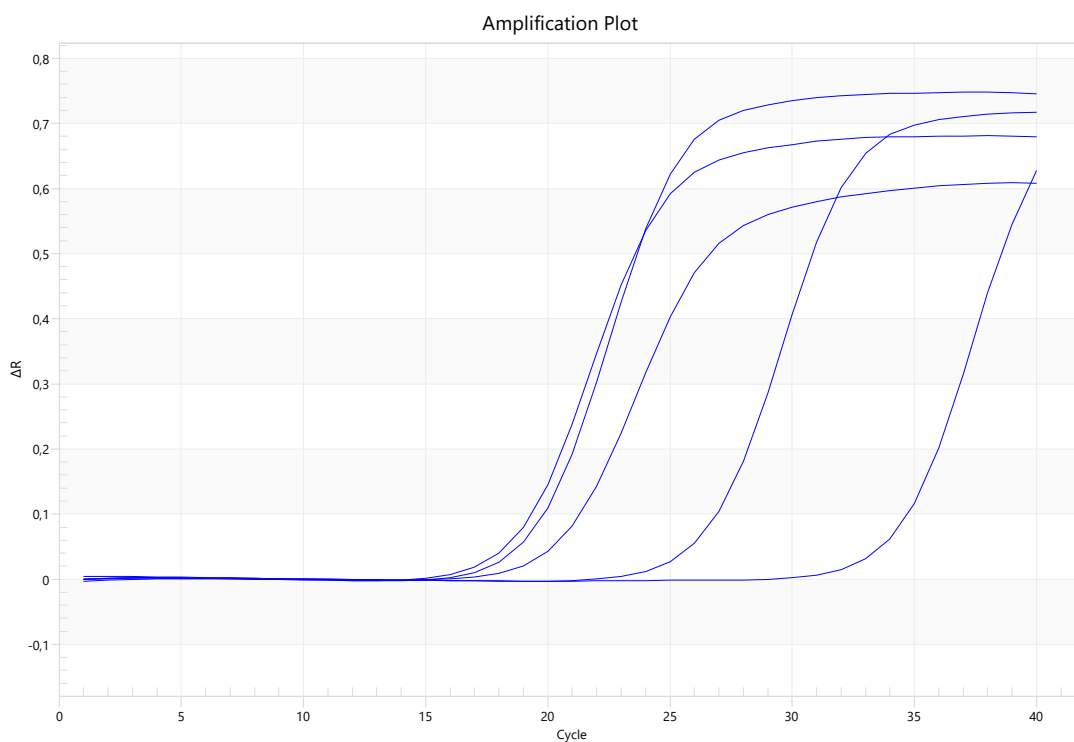
Με βάση τις παραπάνω τιμές το δείγμα 4 μελισσόψωμου εμφανίζει τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα μελισσόψωμου καθώς έχει τη μεγαλύτερη τιμή CC50, δηλαδή απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση του, συγκεκριμένα $8,60 \pm 0,04$ mg/ml, για να εμφανίσει σημαντική κυτταροτοξική δράση. Εξίσου υψηλές είναι οι τιμές CC50 των δειγμάτων 15 και 16 με τιμές $7,56 \pm 0,02$ mg/ml και $8,03 \pm 0,01$ mg/ml αντίστοιχα, που αποτελούν ένδειξη χαμηλότερης κυτταροτοξικής δράσης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αντιθέτως, τα δείγματα 3, 6, 7 και 9 εμφανίζουν την μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση όπως παρατηρείται στον πίνακα με το δείγμα 6 να καταστρέφει το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων σε συγκέντρωση μόλις 0,17mg/ml.

4.2 Υπολογισμός IC₅₀

Από τις αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις των 0,5mg/ml, 0,25mg/ml και 0,125mg/ml από κάθε δείγμα μελισσόψωμου και οι συγκεντρώσεις 2mg/ml, 1mg/ml και 0,5mg/ml από κάθε δείγμα γύρης, 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 προέκυπτε από την qPCR για τις δεδομένες συγκεντρώσεις κάθε δείγματος BB, οι τιμές Ct των υπό μελέτη δειγμάτων να είναι μεγαλύτερες από την τιμή Ct του θετικού μάρτυρα (V.C.). Αυτό οφείλεται στην ανασταλτική δράση που φαίνεται να έχει το μελισσόψωμο με 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 δείγματος 1, τόσο αυξάνεται και η αναστολή του ιικού τίτλου του EV-D68 στο δείγμα, και συνεπώς και ο αριθμός Ct.

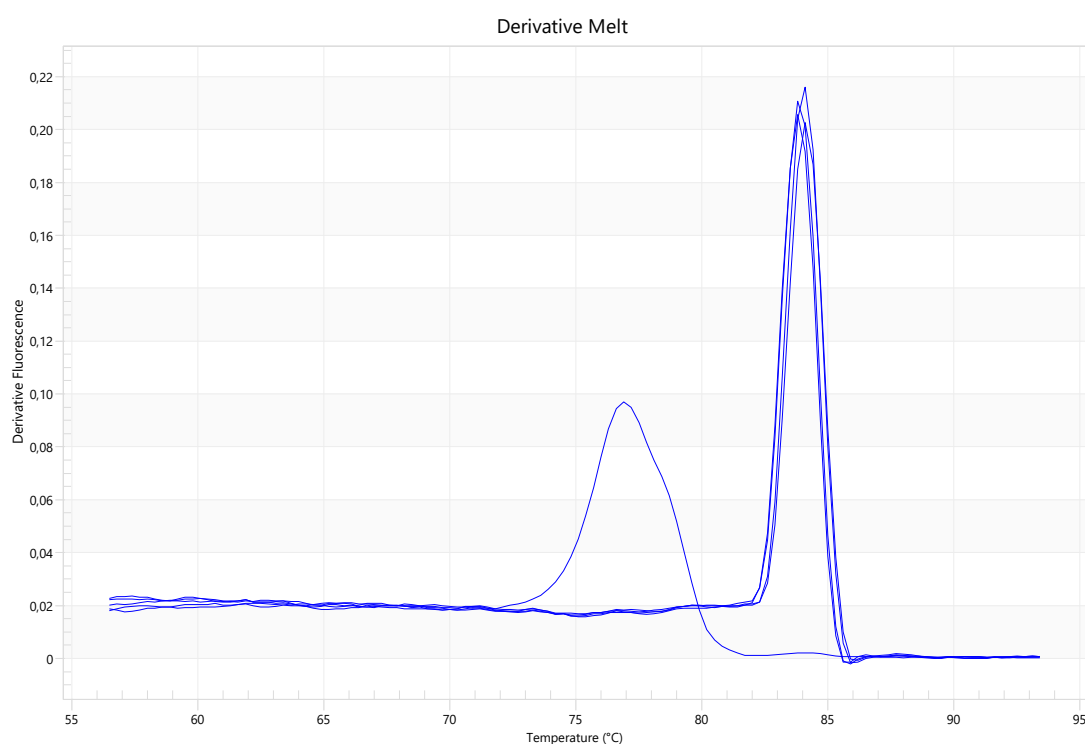


ΕΙΚΟΝΑ 4.2.1: Amplification plot της Real-Time PCR για τις συγκεντρώσεις του δείγματος 1 με σειρά εμφάνισης από αριστερά προς τα δεξιά 0,0625mg/ml: 18,49, 0,125: 19,88, 0,25: 20,4.



ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2.2: Amplification plot της Real-Time PCR για τις συγκεντρώσεις του δείγματος 1 Γύρης με σειρά εμφάνισης από αριστερά προς τα δεξιά των συγκεντρώσεων 0,5mg/ml: 19,71mg/ml: 21,16, 2mg/ml: 26,74.

Στην συνέχεια ακολούθησε ανάλυση της καμπύλης τήξης (Melting Curve) των προϊόντων της qPCR σε κάθε δείγμα μελισσόψωμου και των 2 δειγμάτων γύρης για να επιβεβαιωθεί ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Όπως παρατηρείται στο παρακάτω διάγραμμα, όλα τα υπό μελέτη δείγματα της 1 Γύρης εμφάνισαν μία καμπύλη με μία κορυφή στην ίδια ακριβώς θερμοκρασία αποδιάταξης, επισημαίνοντας την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος, με εξαίρεση το CC που εμφανίζει διαφορετικό προϊόν λόγω των διμερών των εκκινητών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2.3: Melting curve analysis για τα δείγματα 1 γύρης

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

Sample	IC ₅₀	
Beebread	1	0.048
	2	0.31
	3	0.42
	4	0.11
	5	0.33
	6	0.53
	7	0.052
	8	0.091
	9	0.2
	10	1.003
	11	0.182
	12	0.28
	12Λ	0.087
	13	0.5
	14	0.58
	15	0.13
	16	0.34
17	5.45	
Γύρη	1	0.91
	2	0.27

Πίνακας 4.2. Δείγματα μελισσόψωμου και γύρης και οι αντίστοιχες τιμές IC₅₀ (mg/ml).

Η τιμή IC₅₀ ορίζει την ελάχιστη συγκέντρωση μελισσόψωμου που απαιτείται για να επιτευχθεί αναστολή του υϊκού 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 δείγμα 1, όπως παρατηρείται στον παραπάνω πίνακα, παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 0,048mg/ml, όπως και το δείγμα 12Λ και 7 σε συγκέντρωση 0,087 mg/ml και 0,052mg/ml αντίστοιχα έχοντας και τα 2 μικρότερη τιμή IC₅₀ από τα δείγματα γύρης 1 και 2 (0,91mg/ml και 0,27mg/ml) που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης στην παρούσα ερευνητική μελέτη. Αντίθετα, το δείγμα 17 εμφάνισε τη

χαμηλότερη αντιϊκή δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν σε συγκέντρωση 5,45mg/ml.

4.3 Υπολογισμός Selectivity Index

Ο δείκτης εκλεκτικότητας SI υπολογίστηκε με βάση τον τύπο που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο: $SI = CC_{50}/IC_{50}$

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας των αποτελεσμάτων με βάση τα οποία προέκυψε το SI για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

	Sample	(mg/ml)		SI
		CC ₅₀	IC ₅₀	
Beebread	1	4.73 ± 0.02	0.048	98.542
	2	2.32 ± 0.17	0.31	7.484
	3	0.23 ± 0.4	0.42	0.548
	4	8.60 ± 0.04	0.11	78.182
	5	6.83 ± 0.09	0.33	20.697
	6	0.17 ± 0.03	0.53	0.321
	7	1.28 ± 0.06	0.052	24.615
	8	0.63 ± 0.02	0.091	6.923
	9	0.31 ± 0.02	0.2	1.550
	10	5.25 ± 0.07	1.003	5.234
	11	3.78 ± 0.02	0.182	20.769
	12	1.03 ± 0.05	0.28	3.679
	12Α	0.52 ± 0.02	0.087	5.977
	13	3.87 ± 0.04	0.5	7.740
	14	4.15 ± 0.06	0.58	7.155
	15	7.56 ± 0.02	0.13	58.154
	16	8.03 ± 0.01	0.34	23.618
17	0.32 ± 0.05	5.45	0.059	
Γύρη	1	4.85 ± 0.01	0.91	5.330
	2	10.19 ± 0.02	0.27	37.741

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3.1: Αποτελέσματα Selectivity Index για κάθε δείγμα υπολογισμένα με βάση τον λόγο CC₅₀/IC₅₀.

Όπως παρατηρείται με βάση τον πίνακα το δείγμα μελισσόψωμου 1 φαίνεται να έχει και την μεγαλύτερη τιμή εκλεκτικότητας ως προς τον ιό με τιμή 98.542. Στην πορεία ακολουθούν τα δείγματα 4, 7, 11, 15 και 16 με εξίσου υψηλές τιμές (78.182, 24.615, 20.769, 58.154, 23.618 αντίστοιχα) όσον αφορά την εκλεκτικότητας τους προς τον ιό.

Τα δείγματα που παρουσίασαν την μικρότερη εξειδίκευση του ιού ως προς το κάθε δείγμα ήταν τα 17 με τιμή 0.059 , 6 με τιμή 0.321 και το δείγμα 3 με SI=0.548.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μελισσόψωμο αποτελεί κύριο προϊόν της κυψέλης, καθώς οι μέλισσες συλλέγουν πρώτα την γύρη από λουλούδια, μεταφέροντας την στην κυψέλη και στη συνέχεια οι εργάτριες μέλισσες αναμιγνύουν τη γύρη με πεπτικά ένζυμα καθώς και μέλι. Η διαδικασία ακολουθείται από την γαλακτική ζύμωση του μείγματος για να καταλήξει στην δημιουργία τελικά του μελισσόψωμου "Beebread".

Ως προϊόν της κυψέλης είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπίδια, μέταλλα και βιταμίνες, πέραν του ότι αποτελεί πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων (Urcan et al., 2017). Η χημική σύνθεση του ποικίλλει από μια περιοχή στην άλλη και εξαρτάται από τρεις διαφορετικούς παράγοντες όπως είναι τα φυτά του συγκεκριμένου περιβάλλοντος, οι κλιματικοί παράγοντες καθώς και οι εποχιακές διακυμάνσεις (Baltrušaityte et al., 2007).

Πολλές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το μελισσόψωμο έχει ορισμένους βιολογικούς ρόλους, όπως αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις (Md Akhîr et al., 2017). Κυρίως, η βιοδραστικότητα του οφείλεται στην ύπαρξη φαινολικών ομάδων και ιδιαίτερα φλαβονοειδών, τα οποία καθιστούν το μελισσόψωμο αντικείμενο μελέτης για τις δράσεις του καθώς και για φαρμακευτικές εφαρμογές (Kurek-Górecka et al., 2013).

Σε πείραμα που διεξάχθηκαν από τον Sobral και την ομάδα του το 2017 αποδείχθηκε και η αντικαρκινική δραστηριότητα του μελισσόψωμου το οποίο συλλέχθηκε από την βορειοανατολική Πορτογαλία έναντι σε διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως MCF-7 (αδenoκαρκίνωμα μαστού), NCI-H460 (καρκίνος του πνεύμονα), HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας) και HepG2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), και επίσης έναντι μη καρκινικών ηπατικών κυττάρων (ηπατικά κύτταρα χοίρου, PLP2). Όσον αφορά την αντιϊκή δράση του μελισσόψωμου βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη καθώς δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στην επιστημονική κοινότητα. Με αφορμή τα παραπάνω τέθηκε ως στόχος της παρούσας μελέτης η διερεύνηση της αντιϊκής δράσης δειγμάτων μελισσόψωμου από διάφορες περιοχές ανά την Ελλάδα έναντι του εντεροϊού D68.

Είναι γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες αυξάνεται εκθετικά ο αριθμός των περιστατικών που σχετίζονται με αναπνευστικές λοιμώξεις οφειλόμενες στον συγκεκριμένο ιό. Η ευρεία εξάπλωση του EVD68 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. Αυτό που τον διαφοροποιεί από τους υπόλοιπους εντεροϊούς είναι ότι μεταδίδεται μέσω της αναπνευστικής οδού και τα συμπτώματα που παρατηρούνται από την λοίμωξη με τον ιό EV-D68 είναι ο βήχας, το φτέρνισμα, η ρινόρροια, ο πυρετός, η δύσπνοια και πονόλαιμος αλλά και σοβαρότερα συμπτώματα όπως επιδείνωση του άσθματος καθώς πνευμονία. (Esposito et al., 2015, ; Oermann et al., 2014).

Εκτός από τα αναπνευστικά και εμπύρετα συμπτώματά που προκαλεί ο, η λοίμωξη από τον συγκεκριμένο ιό έχει συσχέτιση με την οξεία χαλαρή μυελίτιδα (AFM), μια νευρολογική διαταραχή η οποία επηρεάζει συχνότερα τα μικρά παιδιά και χαρακτηρίζεται από οξεία έναρξη μυϊκής αδυναμίας ενός ή περισσότερων άκρων (Sun Jing et al., 2019).

Προς το παρόν, δεν έχουν βρεθεί εγκεκριμένες θεραπείες για λοιμώξεις από τον EV-D68. Όσον αφορά την θεραπεία των αναπνευστικών νοσημάτων που προκαλεί ο συγκεκριμένος ιός παρέχεται υποστηρικτική φροντίδα, μαζί με την επιπλέον σταθεροποίηση της κατάστασης του άσθματος όπου είναι αναγκαίο.

Ο βασικός άξονας της θεραπείας στο AFM είναι επίσης υποστηρικτικός, μαζί με την έναρξη εντατικών θεραπειών αποκατάστασης (Melicosta et al., 2019). Με βάση τα παραπάνω γεγονότα καθίσταται λοιπόν απαραίτητη η έγκυρη ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού σε δείγματα για την αποφυγή ή τον έλεγχο μιας επιδημίας του (Elrick et al., 2021).

Στην παρούσα έρευνα έγινε προσπάθεια διερεύνησης της πιθανής ευεργετικής δράσης του μελισσόψωμου στην μείωση του ιϊκού τίτλου του EV-D68 *in vitro*. Κάθε υπό μελέτη δείγμα εξετάστηκε ως προς την κυτταροτοξική του δράση σε κύτταρα βδομυοσάρκωματος (RD) και ως προς την αντιϊκή του δράση έναντι του EV-D68, σε συγκεντρώσεις των 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 και 0,125mg/ml. Η μέθοδος MTT αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο για τον καθορισμό του επιπέδου κυτταροτοξικότητας καθώς και για τον προσδιορισμό του ποσοστού

βιωσιμότητας των κυττάρων σε κάθε συγκέντρωση, μέσω του υπολογισμού των τιμών CC_{50} .

Για την δημιουργία των επιθυμητών συγκεντρώσεων προς μελέτη έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου D-MEM σε κάθε αραίωση και τοποθέτηση τους σε πλάκα μικροτιτλοποίησης επιστρωμένη ήδη με κύτταρα RD ώστε να ακολουθήσει ο ενοφθαλμισμός με το πρότυπο στέλεχος του EV-D68 σε συγκέντρωση $10^2 CCID_{50}/100\mu l$. Για κάθε δείγμα μελισσόψωμου χρησιμοποιούνταν μία τριπλέτα σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης για την εξέταση της αντιϊκής δράσης του εκάστοτε δείγματος. Η κάθε πλάκα εξεταζόταν σε καθημερινή βάση μέσω του οπτικού μικροσκοπίου με την παράλληλη καταγραφή της κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) που προκαλούσε ο ιός στα κύτταρα παρουσία του μελισσόψωμου συγκριτικά με τους θετικούς μάρτυρες (V.C.).

Όλα τα δείγματα μελισσόψωμου εμφάνισαν προστατευτική δράση έναντι του ιού η οποία παρατηρήθηκε μικροσκοπικά και οδήγησε στην απομόνωση των δειγμάτων αυτών, την εκχύλιση του RNA τους και στην μετατροπή του σε cDNA μέσω της RT-PCR ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει ενίσχυση της 5'UTR περιοχής του ιικούγονιδιώματος με την Real-Time PCR. Ακολούθησε ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} για κάθε δείγμα, μέσω της εφαρμογής της μεθόδου $2^{-\Delta Ct}$ στα αποτελέσματα της qPCR.

Οι τιμές CC_{50} και IC_{50} που υπολογίστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι χαρακτηριστικές για κάθε δείγμα μελισσόψωμου και είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό καθενός δείγματος από τα παραπάνω. Για να θεωρηθεί λοιπόν ένα δείγμα μελισσόψωμου ιδανικό ως προς την αντιϊκή του δράση, η οποία αποτελεί βασικό στόχο της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης, θα πρέπει να παρουσιάζει υψηλές τιμές CC_{50} και χαμηλές τιμές IC_{50} για κάθε συγκέντρωση στην οποία και μελετάτε. Πιο συγκεκριμένα όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή CC_{50} για κάθε δείγμα τόσο μικρότερη και η κυτταροτοξική δράση του εκάστοτε μελισσόψωμου, καθώς αυτό υποδεικνύει πως απαιτείται υψηλή συγκέντρωση μελισσόψωμου ώστε να καταστραφεί το 50% των κυττάρων μιας μη ενοφθαλμισμένης κυτταροκαλλιέργειας. Η χαμηλή τιμή IC_{50} αντίθετα, υποδεικνύει και υψηλή αντιϊκή δράση καθώς το εκάστοτε δείγμα μελισσόψωμου σε μικρή συγκέντρωση επιτυγχάνει να μειώσει τον ιικό τίτλο του EV-D68 σε

μεγάλο ποσοστό σε μια ενοφθαλμισμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια. Τελικά η αποτελεσματικότητα του κάθε μελισσόψωμου κρίνεται με βάση την εκλεκτικότητα της δράσης του ως προς το ιικό στέλεχος σε σχέση με το κύτταρο ξενιστή η οποία υπολογίζεται από τον λόγο CC_{50}/IC_{50} και χαρακτηρίζεται ως Selectivity Index (SI).

Με βάση λοιπόν τις τιμές CC_{50} και IC_{50} που υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα ξεχωριστά το δείγμα 1 το οποίο και προέρχεται από την περιοχή Σωτηρίτσας Λαρίσης εμφάνισε την ισχυρότερη αντιϊκή δράση με $SI = 98.542$ χωρίς να καταστρέφει τα κύτταρα. Παρομοίως τα δείγματα 4 και 15 προερχόμενα από την Αγιά Λαρίσης και την Πελοπόννησο αντίστοιχα εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ιού EV-D68 με λόγο $SI = 78.182$ για το δείγμα 4 και $SI = 58.154$ για το δείγμα 15. Στα υπόλοιπα δείγματα παρατηρείται εξίσου ανασταλτική δράση έναντι του ιού EV-D68 σε μικρότερο βαθμό όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.3.1. Φαίνεται λοιπόν πως αρκετά από τα υπό μελέτη δείγματα εμφανίζουν ισχυρότερη αντιϊκή δράση συγκρινόμενα με τις γύρες 1 και 2 με τιμές $SI = 5.330$ και $SI = 37.741$ αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως το δείγμα 17 εμφάνισε την υψηλότερη τιμή $IC_{50} = 5.45$ υποδεικνύοντας χαμηλή αντιϊκή δράση σε συνάρτηση με την χαμηλή τιμή $CC_{50} = 0.32$ η οποία σχετίζεται με την έντονη κυτταροτοξική δράση του συγκεκριμένου δείγματος.

Συμπερασματικά, καταλήγουμε πως το συγκεκριμένο προϊόν της κυψέλης (μελισσόψωμο) παρουσιάζει αντιϊκή δράση έναντι του εντεροϊού D68, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του μελισσόψωμου όσον αφορά την ανασταλτική του δράση ως προς τον EV-D68. Όντας ένας επικίνδυνος ιός επιδημιολογικά ως προς τις μεταλλάξεις του και τις λοιμώξεις που προκαλεί κυρίως σε μικρά παιδιά η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει να διευρύνει τα όρια μελέτης του μελισσόψωμου, καθώς αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό εργαλείο έναντι του EV-D68.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Didaras, N.A.; Karatasou, K.; Dimitriou, T.G.; Amoutzias, G.D.; Mossialos, D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics* 2020, 9, 811.
2. Bakour, M.; Fernandes, Â.; Barros, L.; Sokovic, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Lyoussi, B. Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT* 2019, 109, 276–282
3. Dranca F., Florin U., and Mircea O. : Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods*. 2020,9, no. 10
4. Mohammad S, Mahmud-Ab-Rashid N, Zawawi N. : Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. *Molecules*. 2021, 26(4).
5. Khalifa, S.A.M.; Elashal, M.; Kieliszek, M.; Ghazala, N.E.; Farag, M.A.; Saeed, A.; Xiao, J.; Zou, X.; Khatib, A.; Göransson, U.; et al. Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 97, 300–316.
6. Anderson, K.E.; Carroll, M.J.; Sheehan, T.; Mott, B.M.; Maes, P.; Corby-Harris, V. Hive-stored pollen of honeybees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol. Ecol.* 2014, 23, 5904–5917
7. Zuluaga CM, Serrato JC, Quicazan M,. Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian beebread. *Chemical Engineering Transactions*. 2015, 43: 175- 180.
8. Kieliszek, M.; Piwowarek, K.; Kot, A.M.; Błazejak, S.; Chlebowska- Smigiel, A.; Wolska, I. Pollen and bee bread as new health- oriented products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 71, 170–180.
9. Sobral F, Calhelha RC, Barros L, Dueñas M, Tomás A, SantosBuelga C, Ferreira IC, : Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Beebread Collected in Northeast Portugal. 2017 *Molecules*22(2): 248.
10. Mohammad, S.M.; Mahmud-Ab-Rashid, N.K.; Zawawi, N. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *J. Apic.Res.* 2020, 0,1–16.
11. Barajas, J.; Rodríguez, M.; Rodríguez-Sandoval, E. Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia. *J. Food Process. Eng.* 2012, 35, 134–148.

12. Giroud, B.; Vauchez, A.; Vulliet, E.; Wiest, L.; Buleté, A. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2013, 1316, 53–61.
13. Feas, X.; Vazquez-Tato, M.P.; Estevinho, L.; Seijas, J.A.; Iglesias, A. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules* 2012, 17, 8359–8377.
14. Lob, S.; Afiffi, N.; Razak, S.B.A.; Ibrahim, N.F.; Nawi, I.H.M. Composition and identification of pollen collected by stingless bee (*Heterotrigona itama*) in forested and coastal area of Terengganu, Malaysia. *Malays. Appl. Biol.* 2017, 46, 227–232.
15. Campos, M.G.R.; Bogdanov, S.; De Almeida-Muradian, L.B.; Szczesna, T.; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res.* 2008, 47, 154–161.
16. Ivanišová, E.; Kačániová, M.; Frančáková, H.; Petrová, J.; Hutková, J.; Brovarskyi, V.; Velychko, S.; Adamchuk, L.; Schubertová, Z.; Musilová, J. Bee bread—Perspective source of bioactive compounds for future. *Potravinarstvo* 2015, 9, 592–598.
17. Degrandi-Hoffman, G.; Eckholm, B.J.; Huang, M.H. A comparison of bee bread made by Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie* 2013, 44, 52–63.
18. Urcan, A.C.; Al Marghitas, L.; Dezmirean, D.S.; Bobis, O.; Bonta, V.; Muresan, C.I.; Margaoan, R. Chemical Composition and Biological Activities of Beebread—Review. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Anim. Sci. Biotechnol.* 2017, 74, 6–14.
19. De Oliveira Alves, R.M.; Carvalho, C.A.L. Pot-Pollen ‘Samburá’ Marketing in Brazil and Suggested Legislation. In *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*; Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 435–443.
20. Fuenmayor, C.; Zuluaga-Domínguez, C.; Díaz-Moreno, A.; Quicazán, M.; Cosio, S.; Mannino, S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev. MVZ Córdoba* 2014, 19, 4003–4014.
21. Salazar-González, C.; Díaz-Moreno, C. The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *J. Apic. Res.* 2016, 55, 161–175.

22. Dominguez-Valhondo D, Bohoyo GD, Hernández MT, Gonzalez-Gomez D. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011 46: 2204–2211.
23. Berene I, Daberte I, Siksan S. Investigation of beebread and development of its dosage forms. *Medicinos*, 2015, 21(1): 16-22
24. Čeksterytė V, Račys J, Kaškonienė V, Venskutonis PR. Fatty acid composition in beebread. *Biologija* 2008, 54(4): 253–257
25. Čeksterytė V, Balžekas J, Baltuškevičius A, Jurgevičius E. The use of beebread-honey mixture in the treatment of liver diseases in alcohol-dependent patients. *Chemical Technology*, 2012, 60(2): 62-66
26. Čeksterytė V, Navakauskienė R, Treigyte G, Jansen E, Kurtinaitienė B, Dabkevičienė G, Balžekas J. Fatty acid profiles of monofloral clover beebread and pollen and proteomics of red clover (*Trifolium pratense*) pollen. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2016, 80(11): 2100-2108
27. Stanciu O, Marghitas L, Dezmirean D. Examination of antioxidant capacity of beebread extracts by different complementary assays. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine ClujNapoca. Animal Science and Biotechnologies* 2007, 64(1-2)
28. Stanciu OG, Mărghitaş L, Dezmirean D. Macroand Oligo-Mineral Elements from Honeybee-Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* 2009, 66
29. Anđelković B, Jevtić G, Mladenović M, Marković J, Petrović M, Nedić N. Quality of pollen and honey beebread collected in spring. *Journal of Hygienic Engineering and Design* 1: 2012, 275-277.
30. Carpes T, Begnini R, Matias de Alencar S, Masson, ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011, 31: 1818-1825.
31. Morais M, Moreira L, Feás X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, 49: 1096-1101

32. Basim E, Basim H, Özcan M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*. 2006, 77: 992-996.
33. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 63: 233-239
34. Mutsaers M, van Blitterswijk H, van't Leven L, Kerkvliet J, van de Waerdt J. Bee products properties, processing and marketing. Agromisa Foundation. Wageningen. 2005, 34-35.
35. Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Barbosa-Filho JM, Silva EMS, Freitas BM. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Meliponasubnitida*Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19 (6-7): 507-511
36. Abouda Z, Zerdani I, Kalalou I, Faid M, Ahami M T. The antibacterial activity of Moroccan beebread and beepollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Res. J. Microbiol*. 2011, 6: 376–384.
37. Imamura, T., and Oshitani, H. : Global reemergence of enterovirus D68 as an important pathogen for acute respiratory infections. *Rev. Med. Virol*. 2015, 25, 102–114. doi: 10.1002/rmv.1820
38. Messacar, K., Asturias, E., Hixon, A., Van Leer-Buter, C. M., Niesters, H., Tyler, K., et al. : Personal view enterovirus D68 and acute flaccid myelitis— evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect. Dis*. 2018, 18, e239–e247. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30094-X
39. 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
40. Nikonov, E. S. Chernykh, M. B. Garber, E. Yu. Nikonova, Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs., *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 2017, Vol. 57, pp. 119152.
41. Adams, M.J.; King, A.M.; Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to theInternational Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol*. 2013, 158, 2023–2030.
42. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molecular Virology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013
43. Rueckert RR, Dunker A. K. ; Observations on Molecular Weight Determinations on Polyacrylamide Gel. *Chemistry and metabolism of Macromolecules*. Volume 244, issue 18, P5074-5080, September 25, 1969

44. Norkin LC. *Virology: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: ASM Press;2010
45. van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld JM. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*.2015.7(8):4529-62
46. Stanway, G.; Joki-Korpela, P.; Hyypiä, T. Human parechoviruses—Biology and clinical significance. *Rev. Med. Virol.* 2000, 10, 57–69.
47. Liu Y, Sheng J, Fokine A, Meng G, Shin WH, Long F. et al. Structure and inhibition of EVD68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science*. 2015. 347(6217);71-74.
48. 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
49. 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.
50. Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV. *Desk Encyclopedia of General Virology*. AcademicPress; 2010
51. Kloc A, Rai DK, Rieder E. The Roles of Picornavirus Untranslated Regions in Infection and Innate Immunity. *Front.Microbio*.2018. 9.485.
52. Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., Witherell, G. W., and Wimmer, E. Capindependent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site, *Enzyme*, **44**, 292309
53. Jacobson, L. M., Redd, J. T., Schneider, E., Lu, X., Chern, S. W., Oberste, M. S., Erdman, D. D., Fischer, G. E., Armstrong, G. L., Kodani, M., Montoya, J., Magri, J. M., and Cheek, J. E. (2012) Outbreak of lower respiratory tract illness associated with human enterovirus 68 among American Indian children, *Pediatr. Infect. Dis. J.*,1990, 31, 309 312.
54. Oberste, M.S.; Maher, K.; Schnurr, D.; Flemister, M.R.; Lovchik, J.C.; Peters, H.; Sessions, W.; Kirk, C.;Chatterjee, N.; Fuller, S.; et al. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 2577–2584.
55. Brown, B.A.; Nix, W.A.; Sheth, M.; Frace, M.; Oberste, M.S. Seven Strains of Enterovirus D68 Detected in the United States during the 2014 Severe Respiratory Disease Outbreak. *Genome Announc.* 2014, 2, e01201-14.

56. Elrick MJ., Pekosz A., Duggal P. Enterovirus D68 Molecular and Cellular Biology, and Pathogenesis. *J Biol Chem.* 2021
57. Brandenburg, B., Lee, L. Y., Lakadamyali, M., Rust, M. J., Zhuang, X., and Hogle, J. M. : Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.* 2007, 5, e183
58. Panjwani, A., Strauss, M., Gold, S., Wenham, H., Jackson, T., Chou, J. J., Rowlands, D. J., Stonehouse, N. J., Hogle, J. M., and Tuthill, T. J. : Capsid protein VP4 of human rhinovirus induces membrane permeability by the formation of a size-selective multimeric pore. *PLoS Pathog.* 2014, 10, e1004294
59. Strauss, M., Levy, H. C., Bostina, M., Filman, D. J., and Hogle, J. M. : RNA transfer from poliovirus 135S particles across membranes is mediated by long umbilical connectors. *J. Virol.* 2013, 87, 3903–3914.
60. Wells AI, Coyne CB. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses.* 2019.11(5);460
61. Barton, D. J., Morasco, B. J., and Flanagan, J. B. : Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 1999, 73, 10104–10112.
62. Yanmei H., Rami M., Madeleine Z., Jun W., Enterovirus D68 antivirals: past, present and future. *ACS Infect Dis.* 2020 July 10; 6(7): 1572–1586
63. Esposito, S.; Chidini, G.; Cinnante, C.; Napolitano, L.; Giannini, A.; Terranova, L.; Niesters, H.; Principi, N.; Calderini, E. Acute flaccid myelitis associated with enterovirus-D68 infection in an otherwise healthy child. *Virol. J.* 2017, 14, 4
64. Oermann, C.M.; Schuster, J.E.; Connors, G.P.; Newland, J.G.; Selvarangan, R.; Jackson, M.A. Enterovirusd68. A focused review and clinical highlights from the 2014 U.S. Outbreak. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2015,12, 775–781.
65. Jing S., Xiao-Yi H. and Xiao-Fang Y. , Current Understanding of Human Enterovirus D68, *Viruses* 2019, 11, 490; doi:10.3390/v11060490
66. Sejvar, J.J.; Lopez, A.S.; Cortese, M.M.; Leshem, E.; Pastula, D.M.; Miller, L.; Glaser, C.; Kambhampati, A. ; Shioda, K.; Aliabadi, N.; et al. Acute Flaccid Myelitis in the United States, August–December 2014: Results of Nationwide Surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 2016, 63, 737–745.
67. Zheng, Q.; Zhu, R.; Xu, L.; He, M.; Yan, X.; Liu, D.; Yin, Z.; Wu, Y.; Li, Y.; Yang, L.; et al. Atomic structures of enterovirus D68 in complex with two monoclonal antibodies define distinct mechanisms of viral neutralization. *Nat. Microbiol.* 2019, 4, 124–133.

68. Vogt MR, Fu J, Kose N, et al. Human antibodies neutralize enterovirus D68 and protect against infection and paralytic disease. *Sci Immunol* 2020; 5: eaba4902.
69. Schieble, J.H.; Fox, V.L.; Lennette, E.H. A probable new human picornavirus associated with respiratory disease. *Am. J. Epidemiol.* 1967, 85, 297–310
70. Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M. A., Centers for Disease, C., and Prevention. Enterovirus surveillance–United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* 2006, 55, 1–20.
71. Ishiko, H., Miura, R., Shimada, Y., Hayashi, A., Nakajima, H., Yamazaki, S., and Takeda, N. : Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirol.* 2002, 45, 136–141
72. Blomqvist S., Savolainen, C., Raman, L., Roivainen, M., and Hovi, T. : Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4218–4223
73. Holm-Hansen, C., Midgley, S., and Fischer, T. : Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2016 16, e64–e75. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00543-5
74. Midgley, C., Watson, J., Nix, W., Curns, A., Rogers, S., Brown, B., et al. : Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA, a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir. Med.* 2015, 3, 879–887. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00335-5
75. Melicosta, M. E., Dean, J., Hagen, K., Oppenheimer, K., Porter, C., Rybczynski, S., Salorio, C., and Sadowsky, C. : Acute flaccid myelitis: Rehabilitation challenges and outcomes in a pediatric cohort. *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 2019, 12, 245–253
76. Xiang, Z., Liu, L., Lei, X., Zhou, Z., He, B., and Wang, J. : 3C protease of enterovirus D68 inhibits cellular defense mediated by interferon regulatory factor 7. *J. Virol.* 2016, 90, 1613–1621
77. 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
78. Baltrušaityte, V.; Venskutonis, P.R.; Čeksterytė, V. Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technol. Biotechnol.* 2007, 45, 201–208.

79. Md Akhir, Mohd Fadzelly Abu Bakar, Shuaibu Babaji Sanusi, Antioxidant and antimicrobial activity of stingless bee bread and propolis extracts AIP Conference Proceedings 1891, 020090, 2017
80. Kurek-Górecka A., Rzepecka-Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Świerczek-Zięba G., Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. 2013, 19(1): 78–101.
81. Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J. C., Billaudel, S., & Ferré, V. : Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *BioTechniques*, 2000, 29(1), 88–93.
82. Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., Aubert-Combiescu, A., Delpeyroux, F., & Crainic, R. : Natural Genetic Exchanges between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans. *Journal of Virology*, 2000, 74(18), 8434–8443.