

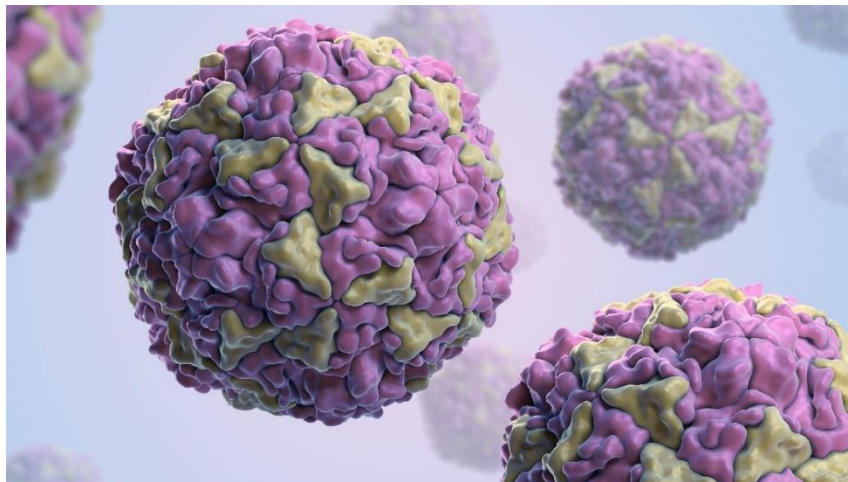


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της αντιϊκής δράσης ελληνικών τύπων μελιού έναντι
Εντεροϊών**

**Study of the antiviral activity of Greek types of honey against
Enteroviruses**



Κοντογιάννης Θεόδωρος

Πατρώνυμο: Αναστάσιος Κοντογιάννης

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

Μελέτη της αντιϊκής δράσης ελληνικών τύπων μελιού έναντι Εντεροϊών

Study of the antiviral activity of Greek types of honey against Enteroviruses

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ:

Ε.ΔΙ.Π Μοριακής Μικροβιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόκαρδα τον Δημητρίου Τηλέμαχο για την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε, για τις συμβουλές του, καθώς και για τη στήριξη του όλων αυτόν τον καιρό.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο που δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή και την υποψήφια διδάκτορα Δάσκου Μαρία για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε στο εργαστήριο αλλά και για τη φιλία της.

Τέλος, θα επιθυμούσα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας για την απεριόριστη συμπαράσταση και τη φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Τι είναι το μέλι	9
1.1.1 Γενικά	9
1.1.2 Διαδικασία παραγωγής.....	10
1.2 Σύσταση μελιού	10
1.2.1 Νερό.....	10
1.2.2 Σακχαρά	11
1.2.3 Πρωτεΐνες, αμινοξέα.....	11
1.2.4 Οργανικά οξέα.....	12
1.2.5 Βιταμίνες	12
1.2.6 Μεταλλικά στοιχεία.....	12
1.2.7 Φαινολικές ενώσεις.....	13
1.2.8 Πτητικές ενώσεις	13
1.2.9 Μικροοργανισμοί	14
1.2.10 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες του μελιού	14
1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού	15
1.3.1 Γεύση.....	15
1.3.2 Άρωμα	15
1.3.3 Χρώμα	16
1.3.4 Κρυστάλλωση	16
1.3.5 Ιξώδες.....	18
1.4 Τα είδη μελιού	19
1.4.1 Θυμαρίσιο μέλι.....	19
1.4.2 Πευκόμελο	19
1.4.3 Μέλι ελάτης.....	20
1.4.5 Μέλι ερείκης.....	21
1.4.6 Μέλι εσπεριδοειδών.....	21
1.4.7 Μέλι βαμβακιού	22
1.4.8 Μέλι Manuka.....	22
1.5 Ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στον άνθρωπο	24
1.5.1 Medical Grade Honey	25
1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση	26
1.5.3 Αντιδιαβητική δράση	26

1.5.4 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	27
1.5.5 Αντιβακτηριακή δράση	28
1.5.6 Αντιμυκητιακή δράση	31
1.5.7 Αντιϊκή δράση.....	32
1.6 Εντεροϊοί.....	33
1.6.1 Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών.....	33
1.6.2 Παθογένεση και επιδημιολογία	35
1.6.3 Αντικατά φάρμακα για εντεροϊούς	38
2. Σκοπός της παρούσας εργασίας	39
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	40
3.1 Δείγματα μελιού.....	40
3.1.1 Ελληνικά δείγματα μελιού	40
3.1.2 Μέλι Manuka.....	41
3.2 Καλλιέργεια των κυττάρων.....	41
3.3 Πειραματικό υικό στέλεχος.....	42
3.4 Μόλυνση κυττάρων και καλλιέργεια των ιών	42
3.5 Μέτρηση υικού τίτλου.....	43
3.6 Αραίωσεις δειγμάτων μελιού και εξέταση της τοξικότητάς τους	44
3.6.1 Δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με MTT	44
3.6.2 Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC ₅₀).....	46
3.7 Μελέτη αντικής δράσης δειγμάτων μελιού	47
3.8 Απομόνωση υικού DNA.....	48
3.9 Αντίστροφη μεταγραφή.....	48
3.10 Real-Time PCR.....	49
3.10.1 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC ₅₀).....	51
3.11 Υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας (SI)	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
4.1 Αποτελέσματα μέτρησης κυτταροτοξικότητας δειγμάτων μελιού στα κύτταρα Rd.	53
4.2 Αντική δράση δειγμάτων μελιού.....	55
4.2.1 Αποτελέσματα αντικής δράσης δειγμάτων μελιού.....	55
4.3 Αποτελέσματα μέτρησης ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC₅₀)	55
4.4 Αποτελέσματα δείκτη επιλεκτικότητας SI.....	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στον άνθρωπο είναι γνωστές από τα αρχαία χρόνια, με πληθώρα αναφορές σε αυτές να συναντώνται σε κείμενα της αρχαίας Ελλάδας. Ωστόσο, μόλις τον τελευταίο καιρό έχει αρχίσει να λαμβάνει ξανά την προσοχή των ερευνητών για τη χρήση του ως εναλλακτικό φάρμακο. Μέσα στις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού, συμπεριλαμβάνονται ικανότητες αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές, αντιδιαβητικές, αντιβακτηριακές και αντιαρκαστικές.

Η παρούσα εργασία εξετάζει τις αντιαρκαστικές ιδιότητες 12 ελληνικών τύπων μελιού με διαφορετική βοτανική και γεωγραφική προέλευση έναντι των εντεροϊών EV-D68, EV-A71, CVB5 και Sabin 1, ενώ διερευνήθηκε και η τοξικότητα των συγκεκριμένων μελιών έναντι της κυτταρικής σειράς Rd. Οι παραπάνω ιδιότητές τους, συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες ιδιότητες του μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει δείξει έντονη αντιαρκαστική ικανότητα.

Η μέτρηση της τοξικότητας των μελιών έναντι της κυτταρικής σειράς Rd πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας βιωσιμότητας των κυττάρων με MTT, ενώ η αντιαρκαστική ικανότητα των μελιών μετρήθηκε ως μεταβολή του αριθμού των ιικών αντιγράφων μέσω της συγκριτικής ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (comparative Real-time PCR). Επιπλέον, για κάθε δείγμα μελιού μετρήθηκε η τιμή CC_{50} (50% cytotoxic concentration), η τιμή IC_{50} (50% inhibitory concentration) και η τιμή SI (selectivity index).

Από τα αποτελέσματα, αποδείχτηκε πως πολλά από τα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν κατάφεραν να αναστείλουν τα διαφορετικά στελέχη Εντεροϊών. Εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος EV-D68, που μόνο το μέλι Manuka κατάφερε να το αναστείλει επιτυχώς. Ακόμη, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι οκτώ από τα ελληνικά μέλια κατάφεραν να αναστείλουν το στέλεχος Sabin 1 πιο αποτελεσματικά από το μέλι Manuka. Προφανώς, η αντιαρκαστική δράση ενός μελιού δε βασίζεται μόνο στο περιεχόμενό του αλλά και στον ιό και στην κυτταρική σειρά που εξετάζεται κάθε φορά.

Φαίνεται, λοιπόν, πως πολλά από τα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία έχουν προοπτικές για να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά φάρμακα για τη θεραπεία μολύνσεων από εντεροϊούς.

ABSTRACT

The beneficial effects of honey on humans are known from the ancient history, as they have been mentioned many times in writings of the ancient Greece. However, only in the past few years, has it started to get back the attention of researchers, for its use as an alternative medicine. Among its therapeutically properties, the honey exhibits antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and antiviral activities.

In the present study, twelve Greek honeys from different botanical and geographical origins were tested to estimate their antiviral activity against the Enteroviruses EV-D68, EV-A71, CVB5, Sabin 1 and their toxicity against the Rd cell line. The properties of each honey were then compared to the respective properties of the Manuka honey, which has been studied thoroughly and has shown potent antiviral activity.

The toxicity of the twelve honeys against the Rd cell line was determined by the MTT cell viability assay, while their antiviral activities were measured as alterations in the number of viral copies, by performing a comparative Real-time PCR. Furthermore, the CC_{50} , IC_{50} and SI values were calculated, for each honey sample.

The results proved that many Greek honey samples that were tested managed to inhibit efficiently the different Enterovirus strains, except for the EV-D68 strain. That strain was only inhibit successfully by the Manuka honey. In addition, it is very important the fact that, eight of the Greek honey samples that were tested, managed to inhibit Sabin 1 more efficiently than the Manuka honey. Obviously, the antiviral activity of a honey sample is not based only on its content, but also on the virus and the cell line that are tested each time.

Therefore, many of the Greek honeys that were tested in this study have the potential to be used as alternative medicines for the treatment of Enterovirus infections.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι το μέλι

1.1.1 Γενικά

Σύμφωνα με την οδηγία 2001/110/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου που βασίστηκε στο πρότυπο του Κώδικα Τροφίμων (Codex Alimentarius), το μέλι ορίζεται ως η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντάς με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν (Codex Stan 12-1981).

Η σύσταση του μελιού περιλαμβάνει διάφορα σάκχαρα, κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη, καθώς και άλλες ουσίες, όπως οργανικά οξέα, ένζυμα και στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη συγκομιδή μελιού. Η οδηγία 2001/110/EK περιορίζει τις ανθρώπινες παρεμβάσεις που θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τη σύσταση του μελιού και επιτρέπει, με τον τρόπο αυτό, να διαφυλαχθεί ο φυσικός χαρακτήρας του (Συμβούλιο Ευρωπαϊκής Ένωσης 2001).



Εικόνα 1.1.1.1: Συλλογή νέκταρος και γύρης από τη μέλισσα *Apis mellifera*.

1.1.2 Διαδικασία παραγωγής

Η διαδικασία παραγωγής μελιού από τις μέλισσες ξεκινά με τη συλλογή του νέκταρος από τα άνθη των φυτών. Το νέκταρ είναι πλούσιο σε σάκχαρα και αποτελείται από περίπου 80% νερό και σύνθετους υδαντάθρακες. Οι μέλισσες, αφού συλλέξουν το νέκταρ, το αποθηκεύουν στο μελιστόμαχο, ένα ειδικό στομάχι των μελισσών που χρησιμοποιείται για την αποθήκευσή του μελιού. Στην κυψέλη, οι μέλισσες «μασάνε» το νέκταρ πολλές φορές και το αναμειγνύουν με ένζυμα που μεταβάλλουν τη σύστασή του και το μετατρέπουν σε ένα υγρό που αποτελείται από μέλι και μεγάλη ποσότητα νερού (Ediriweera & Premarathna, 2012). Η υψηλή περιεκτικότητα νερού στο μερικώς κατεργασμένο μέλι μπορεί να οδηγήσει στη διαδικασία της ζύμωσης μέσω της προώθησης της ανάπτυξης ζυμομυκήτων (Singh & Singh, 2018). Γι'αυτό το λόγο, οι μέλισσες αποθηκεύουν το μέλι στην κηρήθρα για να στεγνώσει και να γίνει πιο πυκνό. Στη συνέχεια, οι μέλισσες κουνώντας τα φτερά τους, προκαλούν την είσοδο αέρα στην κυψέλη, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της εξάτμισης του νερού. Μόλις το μέλι στεγνώσει πλήρως, τα κελιά της κηρήθρας σφραγίζονται με κερί για να διατηρηθεί και να προστατευθεί το μέλι (Ediriweera & Premarathna, 2012).

1.2 Σύσταση μελιού

Το μέλι αποτελείται από περίπου 200 ουσίες και τα σημαντικότερα συστατικά του είναι τα σάκχαρα, το νερό, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, οι βιταμίνες, τα οργανικά οξέα, τα μεταλλικά στοιχεία, οι χρωστικές, οι φαινολικές και οι πτητικές ενώσεις (da Silva et al., 2016). Παρακάτω αναφέρονται εκτενέστερα τα κυριότερα συστατικά του μελιού.

1.2.1 Νερό

Η φυσική υγρασία του μελιού στην κηρήθρα είναι αυτή που απομένει μετά την διαδικασία εξάτμισης του νερού από το μέλι και το ποσοστό της εξαρτάται από τους παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία της συμπύκνωσης, από τις καιρικές συνθήκες αλλά και από το ποσοστό υγρασίας του νέκταρος από το οποίο προήλθε το μέλι. Βέβαια, μετά την εξαγωγή του μελιού από την κηρήθρα, η περιεκτικότητά του σε

νερό μπορεί να αλλάξει λόγω των συνθηκών αποθήκευσής του.

Όπως είναι λογικό, το ποσοστό του νερού στο μέλι διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του μελιού και έχει εύρος συνήθως από 13 – 25%. Αν το μέλι έχει περιεκτικότητα σε νερό μεγαλύτερη από 17% και διαθέτει επίσης αρκετά σπόρια μυκήτων, τότε είναι πολύ πιθανό να προκληθεί ζύμωση. Γι'αυτό το λόγο, ένα τέτοιο μέλι πρέπει να παστεριώνεται ώστε να μην αναπτυχθούν ωσμόφιλοι ζυμομύκητες (White & Doner, 1975). Αξίζει, επιπλέον, να αναφερθεί ότι σύμφωνα με την οδηγία 2001/110/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου το ανώτατο όριο για το ποσοστό υγρασίας στο μέλι είναι 20% ώστε να αποφευχθεί η διαδικασία της ζύμωσης. Ωστόσο, καθιερώθηκε και ένα κατώτατο όριο (13-14%) για το ποσοστό υγρασίας, ώστε να μπορούν να διαλυθούν τα σάκχαρα του μελιού (Συμβούλιο Ευρωπαϊκής Ένωσης 2001).

1.2.2 Σακχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν το 95 – 99 % της ξηράς ύλης του μελιού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Αναλυτικότερα, οι μονοσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν το 75% των σακχάρων που βρίσκονται στο μέλι και οι δισακχαρίτες το 10 – 15 %, ενώ μικρό ποσοστό καταλαμβάνουν και διάφοροι άλλοι υδατάνθρακες (da Silva et al. 2016). Η σύσταση του μελιού σε σάκχαρα διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτού από το οποίο έλαβαν οι μέλισσες το νέκταρ και από τη γεωγραφική του προέλευση (Escuredo et al., 2014; Tornuk et al., 2013). Η συγκέντρωση της φρουκτόζης και της γλυκόζης, όπως και ο λόγος μεταξύ τους, είναι χρήσιμοι δείκτες για την ταξινόμηση των μονοανθικών μελιών (Kaskoniene, Venskutonis, & Ceksteryte, 2010). Σχεδόν σε όλους τους τύπους μελιού, η φρουκτόζη είναι ο υδατάνθρακας με την υψηλότερη συγκέντρωση. Ωστόσο, υπάρχουν και ελάχιστες εξαιρέσεις όπως το μέλι από τα φυτά *Brassica napus* και *Taraxacum officinale*, όπου αυτά τα είδη μελιού περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης απ'ότι φρουκτόζης και γι'αυτό κρυσταλλώνουν αρκετά γρήγορα (Escuredo et al., 2014).

1.2.3 Πρωτεΐνες, αμινοξέα

Η περιεκτικότητα του μελιού σε πρωτεΐνες διαφέρει ανάλογα με το είδος των μελισσών. Το μέλι που παράγεται από τις μέλισσες *Apis mellifera* αποτελείται από 0,2 έως 1,6% πρωτεΐνες (Won, Li, Kim, & Rhee, 2009). Μέσα σε αυτές τις πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνεται μια ποικιλία ενζύμων όπως η ινβερτάση, η καταλάση, η αμυλάση και η οξειδάση της γλυκόζης κ.α. Με την ινβερτάση, την αμυλάση και την οξειδάση της γλυκόζης να είναι τα κυριότερα ένζυμα καθώς έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σχηματισμού του μελιού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Από την άλλη πλευρά, τα αμινοξέα αποτελούν το 1% των συστατικών του μελιού, με την προλίνη να είναι το αμινοξύ με την υψηλότερη συγκέντρωση (50 – 85% των αμινοξέων) (Iglesias et al., 2006). Η προλίνη χρησιμοποιείται σαν δείκτης για την εκτίμηση της ωριμότητας του μελιού και σε ορισμένες περιπτώσεις της νόθευσης του μελιού με προσθήκη ζάχαρης (Hermosín et al. 2003).

1.2.4 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα συναντώνται σε περιεκτικότητα 0,57% στο μέλι, ενώ είναι υπεύθυνα για την οξύτητα του μελιού και συμβάλλουν στην χαρακτηριστική του γεύση. Το πιο άφθονο οργανικό οξύ στο μέλι είναι το γλυκονικό που παράγεται από την ενζυμική πέψη της γλυκόζης (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Επιπλέον, τα οργανικά οξέα χρησιμοποιούνται για την διάκριση των μελιών ανάλογα με τη βοτανική ή/και τη γεωγραφική τους προέλευση (Mato et al., 2006).

1.2.5 Βιταμίνες

Το μέλι επίσης περιέχει μικρές ποσότητες βιταμινών όπως η θειαμίνη (B₁), η ριβοφλαβίνη (B₂), η νιασίνη (B₃), το παντοθενικό οξύ (B₅), η πυριδοξίνη (B₆), η βιοτίνη (B₈), το φυλλικό οξύ (B₉) και η βιταμίνη C. Η βιταμίνη C συναντάται σχεδόν σε όλους τους τύπους μελιού κα έχει αξιολογηθεί κυρίως για την αντιοξειδωτική της δράση (León-Ruiz et al. 2012).

1.2.6 Μεταλλικά στοιχεία

Η συγκέντρωση των μεταλλικών στοιχείων έχει εύρος από 0,04% σε ανοιχτόχρωμο μέλι έως 0,2% σε σκουρόχρωμο. Το πιο άφθονο μέταλλο είναι το κάλιο με το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το σίδηρο και το φώσφορο να ακολουθούν (Alqarni et al., 2012). Τα μεταλλικά στοιχεία σε αντίθεση με τις βιταμίνες και τα αμινοξέα δεν αποικοδομούνται εξαιτίας της έκθεσης τους σε θερμότητα, φως, οξειδωτικούς παράγοντες και ακραίο pH. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς τα μέταλλα αποτελούν συμπράγοντες των ενζύμων για πολλές μεταβολικές διεργασίες και έχουν κομβικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του σώματος. Συνεπώς, θα πρέπει να παρέχονται στον άνθρωπο μέσω της διατροφής (Pohl & Jamroz, 2012).

1.2.7 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που αποτελούνται από δακτύλιους βενζολίου με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα απλά φλαβονοειδή, τα σύνθετα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι ανθοκυανίνες (Lin et al., 2016). Οι φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή αποτελούν βασικό συστατικό του μελιού. Τα φαινολικά συμβάλλουν έντονα στην αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού, προσφέροντας με αυτόν τον τρόπο ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Alvarez-Suarez et al., 2012). Η χημική ποικιλία των φαινολών εξαρτάται από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση του μελιού (Miguel et al., 2017).

1.2.8 Πτητικές ενώσεις

Η γεύση και το άρωμα του μελιού διαμορφώνεται από ένα μίγμα πτητικών ενώσεων που η σύσταση του μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το νέκταρ, τις συνθήκες επεξεργασίας, την προέλευση και την αποθήκευση του μελιού (Castro-Vazquez et al., 2007). Οι πτητικές ενώσεις συχνά προέρχονται από φυτά, από τα οποία έγινε μεταφορά των ενώσεων αυτών στο μέλι. Από την άλλη πλευρά, οι μέλισσες μπορούν να παράγουν ή να μετατρέψουν συστατικά των φυτών σε ενώσεις με πτητικές ιδιότητες. Αυτές οι ενώσεις επηρεάζονται από την επεξεργασία που συμβαίνει μετά τη συγκομιδή και από την παρουσία μικροοργανισμών (da Silva et al., 2016).

1.2.9 Μικροοργανισμοί

Το μέλι έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Επομένως, οι μικροοργανισμοί που περιέχονται στο μέλι είναι αυτοί που αντέχουν την οξύτητα, την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και τις υπόλοιπες αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού. Οι κύριες πηγές μικροβίων στο μέλι είναι η γύρη, το πεπτικό σύστημα των μελισσών, η σκόνη, ο αέρας και τα άνθη. Έτσι, βακτήρια που βρίσκονται στο περιβάλλον γύρω από το μέλι είναι πολύ πιθανόν να βρεθούν και μέσα στο μέλι. Κάποια από τα πιο κοινά είδη μικροοργανισμών που έχουν βρεθεί στο μέλι είναι τα *Bacillus*, *Micrococcus*, *Saccharomyces* και *Clostridium* (Snowdon et al. 1996).

1.2.10 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες του μελιού

Η σύσταση του μελιού και συνεπώς και οι ιδιότητες του επηρεάζονται κατά κύριο λόγο από τη βοτανική προέλευση του μελιού, δηλαδή από το φυτό από το οποίο προήλθε το νέκταρ. Ωστόσο, η γεωγραφική περιοχή από την οποία προήλθε το μέλι αλλά και οι συνθήκες αποθήκευσης του, μπορούν να μεταβάλλουν την ποιότητά του. Πιο συγκεκριμένα, η χημική σύσταση του μελιού επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη ροή νέκταρος, δηλαδή την περίοδο όπου οι κύριες πηγές νέκταρος βρίσκονται σε άνθιση και οι καιρικές συνθήκες ευνοούν την υψηλή παραγωγή νέκταρος και την συλλογή του από τις μέλισσες. Έτσι, το βιοχημικό προφίλ του νέκταρος επηρεάζεται τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά από τη γενετική και τη φυσιολογία του φυτού προέλευσης, τις συνθήκες του κλίματος, τα χαρακτηριστικά του εδάφους και την τυπολογία των επικονιαστών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η σύσταση των αιθέριων έλαιων των φυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωγραφική τους περιοχή, ακόμη και για φυτά κοινής βοτανικής προέλευσης. Πέρα από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση του μελιού, η ποιότητά του επηρεάζεται επίσης από τα χαρακτηριστικά των αποικιών των μελισσών, τον τρόπο συλλογής και παρασκευής του μελιού από τους μελισσοκόμους, καθώς και από τις συνθήκες αποθήκευσής του (Tomczyk et al., 2019).

1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού

1.3.1 Γεύση

Η γεύση του μελιού σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση πολλών συστατικών του. Κατά πρώτο λόγο, για τη γλυκύτητα του μελιού είναι υπεύθυνη η φρουκτόζη. Συγκεκριμένα, η φρουκτόζη είναι ο υδατάνθρακας με την υψηλότερη συγκέντρωση στο μέλι, ενώ θεωρείται πως είναι πιο γλυκιά από τη σουκρόζη και τη γλυκόζη (Aljohar et al., 2018; Aparna & Rajalakshmi, 1999). Επιπλέον, όλοι οι τύποι μελιού παρουσιάζουν έναν βαθμό οξύτητας λόγω της παρουσίας οργανικών οξέων. Τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής γεύσης του μελιού αλλά και στις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Το πιο σημαντικό οργανικό οξύ του μελιού είναι το γλυκονικό (Cianciosi et al., 2018).

1.3.2 Άρωμα

Οι ενώσεις που ευθύνονται τη χαρακτηριστική οσμή του μελιού βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στο μέλι. Παρ'όλ' αυτά, το άρωμα είναι ένα από τα πιο εξέχοντα χαρακτηριστικά του μελιού που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της ποιότητάς του. Το συνολικό άρωμα του μελιού επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη βοτανική προέλευση του μελιού, τις συνθήκες αποθήκευσης του και τη φυσιολογία της μέλισσας. Έτσι, το άρωμα, μεταξύ διαφορετικών ειδών μελιών, διαφέρει. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί πάνω από 600 πτητικές οργανικές ενώσεις στο μέλι, ο αριθμός των ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το άρωμα του μελιού είναι πολύ μικρός.

Ορισμένες ουσίες που βρέθηκαν ότι ευθύνονται για το άρωμα του μελιού είναι η 2-μεθόξυφαινόλη, η φαινυλ-εθυλ-αλκόολη, το βενζονιτρίλιο, το 3-μεθόξυ βουτανοϊκό οξύ, η βενζαλδεΐδη και το βενζοϊκό οξύ. Ενώ, άλλες μελέτες έδειξαν πως οι ενώσεις που είχαν την μεγαλύτερη συμμετοχή στην οσμή του μελιού φαγόπυρου ήταν η β-δαμασκηνόνη, οι 2-μεθυλβουτανάλη και 3-μέθυλβουτανάλη και η σοτολόνη (Ruisinger & Schieberle, 2012).

1.3.3 Χρώμα

Η διεθνής αγορά απαιτεί συγκεκριμένα χρώματα μελιού, παραδείγματος χάριν στην Ευρώπη προτιμάται το σκουρόχρωμο μέλι που έχει πιο έντονη γεύση, ενώ στην Βόρειο Αμερική προτιμάται το ανοιχτόχρωμο, του οποίου η γεύση είναι πιο ήπια. Επίσης, έχει αναγνωρισθεί πως υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της έντασης του χρώματος του μελιού και της αντιοξειδωτικής του ικανότητας, καθώς το σκουρόχρωμο μέλι έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά και σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες απ'ότι το ανοιχτόχρωμο. Το χρώμα του μελιού οφείλεται σε χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται σε αυτό, τα οποία εξαρτώνται από τη γεωγραφική και τη βοτανική προέλευση του μελιού. Ακόμη, η ωριμότητα του μελιού, οι συνθήκες αποθήκευσής του, η περιεκτικότητά του σε νερό, σε σάκχαρα και σε γύρη επηρεάζουν την ένταση του χρώματος (Al-Farsi et al., 2018).



Εικόνα 1.3.3.1: Η ποικιλία χρωμάτων του μελιού.

1.3.4 Κρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση συμβαίνει φυσικά στο μέλι και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο χειρισμό και στην επεξεργασία του. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί ή να επιβραδυνθεί η κρυστάλλωση, ώστε να αυξηθεί η ποιότητα του μελιού. Ορισμένες ποικιλίες μελιού όπως το μέλι μελιτώματος που παράγεται στην Ελλάδα δεν κρυσταλλώνει γρήγορα, ενώ άλλα είδη μελιού είναι πιο επιρρεπή σε κρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση μπορεί να είναι ανομοιόμορφη ή ομοιόμορφη. Στην πρώτη περίπτωση, η κρυστάλλωση συμβαίνει αργά και οι κρύσταλλοι λόγω του βάρους τους καθιζάνουν, σχηματίζοντας ένα στρώμα γλυκόζης στον πυθμένα. Έτσι, αυξάνεται η υγρασία στο υπερκείμενο και το μέλι κινδυνεύει να ζυμωθεί από τους ζυμομύκητες που περιέχει και συνεπώς να ξινίσει. Κατά την ομοιόμορφη κρυστάλλωση, η διαδικασία πραγματοποιείται με ταχύ ρυθμό και το μέλι δεν κινδυνεύει να ξινίσει, ενώ δεν αλλοιώνονται και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του (Αλλυσανδράκης, 2007).

Η κρυστάλλωση του μελιού είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού κρυστάλλων μονοϋδριδικής γλυκόζης που διαφέρουν σε αριθμό, σχήμα, διαστάσεις και ποιότητα ανάλογα με τη σύσταση του μελιού και τις συνθήκες αποθήκευσής του. Μόλις το μέλι κρυσταλλωθεί, το χρώμα του γίνεται πιο ανοιχτό λόγω του λευκού χρώματος των κρυστάλλων της γλυκόζης (Olaitan et al., 2017). Για το φαινόμενο αυτό ευθύνεται η χαμηλή διαλυτότητα της γλυκόζης, ενώ η φρουκτόζη που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη διαλυτότητα παραμένει στη διαλυτή της μορφή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Ο ρυθμός κρυστάλλωσης της γλυκόζης εξαρτάται από δύο παράγοντες, τον συντελεστή διάχυσης της γλυκόζης που εξαρτάται από το ιξώδες του μελιού και τον κορεσμό της διαλυτότητας. Αν αυξηθεί η θερμοκρασία τότε η διαλυτότητα της γλυκόζης αυξάνεται και η τάση για κρυστάλλωση μειώνεται. Από την άλλη πλευρά, όταν η θερμοκρασία μειωθεί αρκετά, ο συντελεστής διάχυσης της γλυκόζης μειώνεται και αυτός, με αποτέλεσμα ξανά να επιβραδύνεται η διαδικασία της κρυστάλλωσης. Έτσι λοιπόν, ο ρυθμός κρυστάλλωσης του μελιού κορυφώνεται σε βέλτιστη θερμοκρασία 10 – 15 °C. Ακόμη, η υψηλή περιεκτικότητα του μελιού σε γλυκόζη και η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, ευνοεί τη διαδικασία της κρυστάλλωσης του. Πιο συγκεκριμένα, όσο πιο μεγάλη η τιμή του λόγου $G - W / F$, όπου $G =$ γλυκόζη, $W =$ νερό και $F =$ φρουκτόζη, τόσο πιο γρήγορη κρυστάλλωση του συγκεκριμένου μελιού (Al-Habsi et al., 2013).



Εικόνα 1.3.4.1: Η κρυστάλλωση του μελιού.

1.3.5 Ιξώδες

Ένα ακόμη ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό που συμβάλλει στην ποιότητα του μελιού είναι το ιξώδες του και υπάρχουν πολλοί φυσικοί αλλά και βιοχημικοί παράγοντες που μπορούν να το μεταβάλλουν. Ορισμένοι από αυτούς είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, η παρουσία κρυστάλλων, τα κολλοειδή και τα σάκχαρα (Saxena et al., 2014). Ειδικότερα, η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του μελιού. Επίσης, το ιξώδες σχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητα του μελιού σε νερό, όπου όσο πιο μεγάλη είναι η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό, τόσο μικρότερο είναι το ιξώδες του. Παράλληλα, συστατικά του μελιού όπως οι δεξτρίνες, οι πρωτεΐνες και άλλες κολλοειδείς ενώσεις που περιέχει, αυξάνουν το ιξώδες. Η κοκκιοποίηση του μελιού επίσης αυξάνει το ιξώδες του μελιού σε μεγάλο βαθμό.

Αξίζει να τονιστεί ότι το ιξώδες έχει άμεση σχέση με την ικανότητα των σωματιδίων να ρέουν μέσα στο μέλι. Ένα υψηλό ιξώδες οδηγεί σε χαμηλή ροή των σωματιδίων και συνεπώς σε παρεμπόδιση της ομογενοποίησης και περιορισμό της χρήσης του στη βιομηχανία τροφίμων. Γίνεται, επομένως, εύκολα, αντιληπτό, πως το ιξώδες μπορεί να επηρεάσει τις αισθητικές ιδιότητες του μελιού και συνεπώς και την αποδοχή του από τους καταναλωτές (Machado De-Melo et al., 2018).

1.4 Τα είδη μελιού

Το μέλι χωρίζεται σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με την πηγή προέλευσής του, το μέλι ανθέων ή αλλιώς μέλι νέκταρος που παράγεται από το νέκταρ φυτών και το μέλι μελιτώματος που λαμβάνεται από το χυμό δασικών φυτών ή από τις εκκρίσεις των εντόμων που τρέφονται από αυτά (Castro-Vázquez et al., 2006). Επιπλέον, το μέλι κατηγοριοποιείται ανάλογα με το από πόσους διαφορετικούς τύπους φυτών προήλθε. Μονοανθικό μέλι είναι το μέλι που προήλθε από μέλισσες που τρέφονται από ένα μόνο τύπο φυτού και παίρνει το όνομα του συγκεκριμένου φυτού, ενώ πολυανθικό είναι το μέλι που έχει περισσότερες από μια βοτανικές πηγές προέλευσης, όπως για παράδειγμα το μέλι δάσους (Alvarez – Suarez et al., 2014). Έτσι, τα μονοανθικά είδη μελιού κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ανάλογα με το φυτό από το οποίο προήλθε το νέκταρ που έλαβαν οι μέλισσες. Κάθε τύπος μελιού έχει τις δικές του χαρακτηριστικές ιδιότητες, οι οποίες παρατίθενται παρακάτω.

1.4.1 Θυμαρίσιο μέλι

Το θυμαρίσιο μέλι παράγεται κυρίως στις χώρες της Μεσογείου και στη Νέα Ζηλανδία από φυτά του γένους *Thymus* (Eleftheriou et al., 2009). Στην Ελλάδα, το θυμαρίσιο μέλι αποτελεί το 10% του ετήσια παραγόμενου μελιού και παράγεται ως επί το πλείστον στα νησιά αλλά και σε όλη την ηπειρώτικη χώρα που φυτρώνουν τα διάφορα είδη θυμαριού. Το μέλι αυτό είναι άριστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού χρώματος και γεύσης του (Θρασυβούλου et al., 2002). Η σύσταση του ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή από την οποία προήλθε, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μια ανάμειξη των *T. capitatus*, *Satureja thymbra* L. και *Origanum vulgare* L., ενώ και το *Thymus serpyllum* L. είναι παρόν αλλά σε μικρότερο ποσοστό (Eleftheriou et al., 2009).

1.4.2 Πευκόμελο

Το πευκόμελο αποκτάται με τη συλλογή του μελιτώματος που εκκρίνεται από το έντομο *Marchalina hellenica*. Ο συγκεκριμένος τύπος μελιού παράγεται από τον χυμό των πεύκων και είναι πλούσιο σε μεταλλικά στοιχεία, ενώ σε σύγκριση με τα άλλα είδη μελιού, το πευκόμελο περιλαμβάνει υψηλότερα ποσοστά οργανικών οξέων, μετάλλων, πρωτεϊνών, αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων (Eraslan et al., 2010). Επιπλέον, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη, η κρυστάλλωση του πραγματοποιείται με πολύ αργό ρυθμό. Η Ελλάδα και η Τουρκία είναι οι δύο χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή πευκόμελου στον κόσμο, με το 65% της συνολικής παραγωγής του μελιού στην Ελλάδα να είναι πευκόμελο (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.4.3 Μέλι ελάτης

Το μέλι ελάτης είναι μια από τις πιο γνωστές ποικιλίες μελιού στην Ευρώπη. Έχει χαρακτηριστική οσμή που ομοιάζει αυτή της ρητίνης και γλυκιά γεύση με ευχάριστη, ρητινώδη επίγευση. Το συγκεκριμένο είδος μελιού διαθέτει σχετικά υψηλά επίπεδα φαινολικών, ενώ έχει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Kus et al., 2017). Λόγω της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά, το μέλι ελάτης έχει επίσης αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φυσικό φάρμακο για την επούλωση πληγών (Majtan et al., 2013). Επιπλέον, διαθέτει χαμηλά επίπεδα γλυκόζης με αποτέλεσμα να μην κρυσταλλώνει, γεγονός που το κάνει περιζήτητο για ανάμιξη σε εμπορικούς τύπους. Στην Ελλάδα παρατηρούνται τρία είδη ελάτης, η ελάτη η κεφαλληνιακή (*Abies cephalonica*) που βρίσκεται στις ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου, η ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba* ή *A. pectinata*) που απαντάται σε περιοχές βορείως του Ολύμπου και η υβριδογενής ελάτη (*A. borisii*) που συναντάται στην οροσειρά της Πίνδου. Η ελάτη συμβάλλει κατά 5 – 10 % στην ετήσια συνολική παραγωγή μελιού της Ελλάδας (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.4.4 Μέλι καστανιάς

Το μέλι καστανιάς παράγεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις της Καστανιάς (*Castanea sativa*) που είναι ένα αξιόλογο μελισσοκομικό φυτό και αρκετά διαδεδομένο στην ορεινή ζώνη της Ελλάδας. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* που συναντάται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελα που περιβάλλουν τους καρπούς. Το μέλι καστανιάς έχει

μικρότερη περιεκτικότητα σε ζύμες και ανθίσταται περισσότερο στη ζύμωση από άλλα μέλια. Ανάλογα με την προέλευσή του, ποικίλλει και το χρώμα του από ανοιχτό καφέ σε σκούρο καφέ και μαύρο αν πρόκειται για μελίτωμα (Θρασυβούλου et al., 2002). Επιπλέον, έχει έντονη γεύση και οσμή. Παραδοσιακά, το μέλι καστανιάς χρησιμοποιούταν για τη θεραπεία πληγών λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε φαινολικά και φλαβονοειδή, ενώ ο ιστός της καστανιάς έχει βρεθεί ότι περιέχει ενώσεις με ανασταλτικές επιδράσεις σε μικροοργανισμούς (Park et al., 2017).

1.4.5 Μέλι ερείκης

Στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών από την νεκταροέκκριση των οποίων παράγονται οι αντίστοιχοι τύποι μελιού. Τα φυτά αυτά είναι η φθνοπωρινή ερεική (*Erica verticallata*), η ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδεντρο (*Rhododendron*). Χαρακτηριστικό του ερεικόμελου είναι η υψηλή του περιεκτικότητα σε γλυκόζη που έχει σαν αποτέλεσμα να κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα σε έναν με τρεις μήνες. Έχει κοκκινωπό χρώμα και χαρακτηριστική γεύση και οσμή. Ακόμη, λόγω της υψηλής του υγρασίας και της περιεκτικότητάς του σε ζαχαρομύκητες, το μέλι αυτό είναι επιρρεπές σε ζύμωση και συνεπώς ξινίζει εύκολα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.4.6 Μέλι εσπεριδοειδών

Η Ελλάδα παράγει 12 – 13 χιλιάδες τόνους μέλι το χρόνο, με το 10% της παραγωγής να αποτελεί το μέλι εσπεριδοειδών. Οι δύο περιοχές της Ελλάδας με την υψηλότερη παραγωγή μελιού εσπεριδοειδών είναι το Άργος (Πελοπόννησος) και η Άρτα (Ήπειρος) (Karabagias et al., 2014). Οι πορτοκαλιές που αποτελούν και το κύριο είδος των εσπεριδοειδών (*Citrus sinensis L.*) είναι μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή νέκταρος για την παραγωγή του μελιού, ενώ μικρότερης σημασίας είναι τα μανταρινιές (*Citrus reticulata*) και τα λεμονιές (*Citrus limon*). Ο τύπος αυτός μελιού διακρίνεται από την έντονη οσμή του, τη χαρακτηριστική του ήπια γεύση και τη γρήγορη ταχύτητα κρυστάλλωσης του (Karabagias et al., 2017).

1.4.7 Μέλι βαμβακιού

Το μέλι βαμβακιού είναι μια από τις αμιγείς κατηγορίες μελιού που παράγει η Ελλάδα σε μεγάλες ποσότητες. Σε αντίθεση με το τυπικό σκοτεινόχρωμο μέλι μελιτωμάτων, το μέλι βαμβακιού από μελίτωμα, είναι ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται άχρωμο, ενώ μερικές φορές η γεύση του δεν είναι ιδιαίτερα καλή. Το βαμβακόμελο που προέρχεται από το άνθος, είναι επίσης ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται γαλακτόχρωμο. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το μέλι βαμβακιού είναι το πλουσιότερο μέλι σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και συνεπώς εμφανίζει αρκετά υψηλή βακτηριοκτόνο δράση (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.4.8 Μέλι Manuka

Manuka ή αλλιώς *Leptospermum scoparium* ονομάζουμε ένα είδος θάμνου με κόκκινα, ροζ ή άσπρα άνθη της οικογένειας *Myrtaceae*. Το φυτό αυτό είναι ενδογενές στη Νέα Ζηλανδία και στην ανατολική Αυστραλία. Το όνομα «manuka» έχει προέλευση από τη γλώσσα των Maori, που είναι μια γηγενής φυλή της Νέας Ζηλανδίας. Πέρα από την αισθητική αξία του, το φυτό αυτό είναι ιδιαίτερα γνωστό για την παραγωγή ενός πολύ υγιεινού μονοανθικού μελιού, του μελιού Manuka. Το μεγαλύτερο ποσοστό του μελιού Manuka παράγεται στη Νέα Ζηλανδία και μεταφέρεται από κεί στις υπόλοιπες χώρες.

Το μέλι Manuka είναι γνωστό για τις ευεργετικές του επιδράσεις στον πονόλαιμο, στα εγκαύματα, σε μολύνσεις με μικρόβια, στην ακμή και σε πολλές άλλες καταστάσεις. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή gel για τοπική εφαρμογή σε σημεία του σώματος ώστε να αναστείλει την ανάπτυξη μικροβίων και να επιταχύνει την επούλωση πληγών. Χορηγείται επίσης με τη μορφή κάψουλας, παστίλλιας και ποτού. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σαν συστατικό αντιμυκητιακών κρεμών, καθώς λόγω της περιεκτικότητάς του σε οργανικά οξέα μπορεί να δράσει εναντίον παθογόνων μυκήτων. Ακόμη, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία των καλλυντικών λόγω των αντιβακτηριακών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του (Patel & Cichello, 2013).

Οι θεραπευτικές επιδράσεις του μελιού Manuka οφείλονται στο περιεχόμενο του σε φυτοχημικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, το μέλι Manuka περιέχει υψηλή

συγκέντρωση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης που καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης και παράγει H_2O_2 που διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επίσης, παράγεται η ένωση D-γλύκονο-δ-λακτόνη που μειώνει το pH του μελιού και έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ωστόσο, η κύρια ένωση που ευθύνεται για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού Manuka είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO), μια μορφή αλδεΐδης του πυροσταφυλικού οξέος.

Με την ολοένα και αυξανόμενη τάση για νόθευση και εσφαλμένη επισήμανση τροφίμων υψηλής αξίας, η εξασφάλιση της αυθεντικότητας αυτών των τροφίμων μετατρέπεται σε ένα ένα ταχέως αναδυόμενο φαινόμενο. Συγκεκριμένα, είναι αρκετά συχνή η προσθήκη συνθετικών χημικών σε διαφορετικά είδη μελιού, ώστε να παρουσιάζονται ως μέλια Manuka (McDonald et al., 2018). Για να αποφευχθούν αυτές οι περιπτώσεις απάτης των καταναλωτών χρησιμοποιείται ο «μοναδικός παράγοντας Manuka» (Unique Manuka Factor, UMF) ο οποίος λειτουργεί ως δείκτης της ποιότητας του μελιού Manuka, ώστε να αναγνωρισθούν τα μέλια που δεν έχουν νοθευθεί (Patel & Cichello, 2013). Η τιμή UMF που θα λάβει το μέλι είναι ανάλογη των επιπέδων ενός συνδυασμού δεικτών που βρίσκονται στο μέλι Manuka. Ένας τέτοιος δείκτης είναι το περιεχόμενο του μελιού σε φαινόλες. Στην περίπτωση αυτού του δείκτη, ο UMF αναπαριστά την ισοδύναμη συγκέντρωση φαινόλης (% w/v) που απαιτείται για να πετύχει την ίδια αντιβακτηριακή δράση με το μέλι (Johnston et al., 2018).

Ένας ακόμη δείκτης του οποίου η συγκέντρωση συσχετίζεται με την τιμή του UMF που δίνεται στο μέλι, είναι η μεθυλγλυοξάλη, υποδεικνύοντας έτσι πως η MGO είναι η κύρια υπεύθυνη ένωση για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Ωστόσο, ακόμη και αν η μεθυλγλυοξάλη θεωρείται ως το μόριο που είναι υπεύθυνο για την αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka, μελέτες έδειξαν πως και χωρίς την ύπαρξη μεθυλγλυοξάλης το συγκεκριμένο μέλι ήταν ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη του *P. aeruginosa* χωρίς ιδιαίτερη διαφορά. Αντιθέτως, σε άλλα βακτήρια, όπως τα *Bacillus subtilis* και *S. Aureus* υπήρξε μείωση της ικανότητας του να αναστέλλει την ανάπτυξή τους (Roberts et al., 2015). Η συγκέντρωση μεθυλγλυοξάλης στο μέλι Manuka είναι αρκετά υψηλότερη απότι σε άλλα είδη μελιού, αν και η προσθήκη της διυδροξυακετόνης που είναι το πρόδρομο μόριο της MGO, μπορεί να οδηγήσει στην ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης MGO στα άλλα είδη μελιού (Roberts et al., 2015). Έτσι, είναι δυνατόν να παρουσιαστούν διαφορετικά είδη μελιών, ακόμη και τα πολυανθικά, ως μέλια

Manuka. Η διυδροξυακετόνη είναι επίσης ένας δείκτης για την ένδειξη της αυθεντικότητας του μελιού Manuka

Εκτός από τους δείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ένας ακόμη δείκτης χρησιμοποιείται ευρέως λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που προσφέρει. Ο δείκτης αυτός ονομάζεται λεπτοσπερίνη, είναι ιδιαίτερα σταθερός και σε αντίθεση με τη μεθυλγλυοξάλη δεν μεταβάλλεται κατά την αποθήκευσή του (Kato et al., 2014). Η τελική τιμή του UMF προκύπτει από τα επίπεδα των παραπάνω δεικτών συνδυαστικά και θα πρέπει να είναι όλοι οι δείκτες παρόντες στο μέλι για να θεωρηθεί πως είναι μέλι Manuka. Τέλος, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή UMF τόσο μεγαλύτερη είναι και η παρουσία των ιδιαίτερων ευεργετικών χαρακτηριστικών του μελιού Manuka.

Παρά τις πολλές ευεργετικές δράσεις του μελιού Manuka, έχουν προκύψει και ορισμένοι προβληματισμοί σχετικά με τη χρήση του. Η μεθυλγλυοξάλη που είναι υπεύθυνη για την αντιβακτηριακή δράση του μελιού, αποτελεί και πρόδρομο μόριο για την παραγωγή προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End-Products, AGEs) που έχουν έντονη οξειδωτική δράση. Συνεπώς, η μεθυλγλυοξάλη μαζί με τα παράγωγα της μπορούν να επιφέρουν δυσμενείς επιπτώσεις σε διαβητικούς (Patel & Cichello, 2013).



Εικόνα 1.4.8.1: Άνθη του *Leptospermum scoparium*.

1.5 Ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι ως ένα φυσικό προϊόν έχει λάβει την προσοχή των ερευνητών για την δράση του ως συμπληρωματικό και εναλλακτικό φάρμακο. Η χρήση του μελιού ως

φάρμακο για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών έχει πηγή από τα αρχαία χρόνια (Ahmed et al., 2018). Η σημασία του μελιού για τον άνθρωπο αναφέρεται σε κλασσικά κείμενα της αρχαίας Ελλάδας, όπως η Ιλιάδα, η Οδύσσεια αλλά και σε φιλοσοφικά κείμενα του Πλάτωνα και του Αριστοτέλη (Israïli, 2014). Γενικά, το μέλι έχει πολλές θεραπευτικές επιδράσεις και συγκεκριμένα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο:

- Αντιοξειδωτικό
- Αντιφλεγμονώδες
- Αντιδιαβητικό
- Αντιβακτηριακό
- Αντιμυκητιακό
- Αντικό.

1.5.1 Medical Grade Honey

Το μέλι έχει ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο. Ωστόσο, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην ποιότητα του μελιού που χρησιμοποιείται για τις διάφορες θεραπείες, καθώς μπορεί να περιέχει τοξικές ουσίες, όταν τα φυτά, από τα οποία λαμβάνεται το μέλι ψεκάζονται με ζιζανιοκτόνα ή μολύνονται με βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά. Ακόμη, συχνά δε δίνεται ιδιαίτερη προσοχή σε βακτηριακές μολύνσεις του μελιού όπως για παράδειγμα μολύνσεις με ενδοσπόρια του *Clostridium*. Έτσι το μέλι που λαμβάνεται απευθείας από τους μελισσοκόμους ή από καταστήματα πιθανόν να μην είναι ασφαλή για ιατρική χρήση. Ειδικότερα, για να θεωρηθεί πως ένα μέλι είναι ασφαλές για τη χρήση του σε θεραπείες, χρειάζεται να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- είναι οργανικό και δεν περιλαμβάνει μολυσματικούς παράγοντες και τοξικές ουσίες,
- είναι αποστειρωμένο με γ-ακτινοβολία σε ελεγχόμενες συνθήκες και δεν περιέχονται μικροοργανισμοί σε αυτό,
- μπορεί να εφαρμοστεί σε θεραπείες,
- ακολουθεί αυστηρούς κανονισμούς για τις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης,

- συμβαδίζει με τα φυσικοχημικά κριτήρια που είναι σημαντικά για τη χρήση του μελιού ως προϊόν για τη θεραπεία πληγών (Hermanns et al., 2019).

Το Medical Grade Honey συλλέγεται σε περιβάλλον από το οποίο απουσιάζουν οι μολυσματικοί παράγοντες, όπως τα ζιζανιοκτόνα, τα φυτοφάρμακα και τα βαρέα μέταλλα.

1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση

Το μέλι από διαφορετικές βοτανικές και γεωγραφικές πηγές προέλευσης έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα κύρια συστατικά του μελιού που είναι υπεύθυνα για αυτή του τη δράση είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, ενώ επίσης συμβάλλουν σε μικρότερο βαθμό και τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα οργανικά οξέα και άλλα συστατικά του (Ahmed et al., 2018). Ακόμη, μελέτες έδειξαν πως το μέλι ανέβασε τα επίπεδα και τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως το β-καροτένιο, η βιταμίνη C, η αναγωγή της γλουταθειόνης και το ουρικό οξύ σε υγιή άτομα (Al-Waili, 2003).

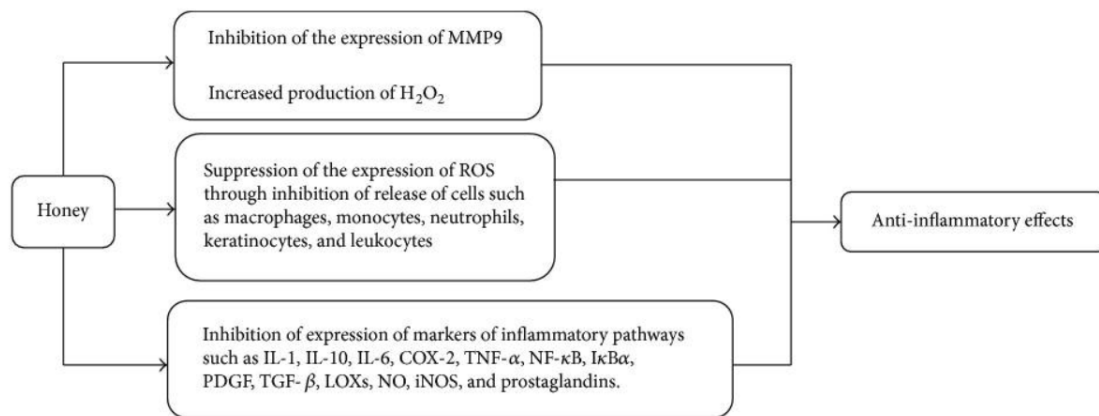
1.5.3 Αντιδιαβητική δράση

Ο διαβήτης είναι ένα μεταβολικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης ή από αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη. Η αντιδιαβητική/υπογλυκαιμική δράση του μελιού οφείλεται στην παρουσία φρουκτόζης σε αυτό. Πιο συγκεκριμένα, η φρουκτόζη βοηθά στη ρύθμιση του συστήματος απόκρισης στην ινσουλίνη και συνεπώς ελέγχει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ώστε να βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης μειώνει την πρόσληψη φαγητού μέσω καθυστέρησης της γαστρικής κένωσης. Μαζί με την φρουκτόζη, ένας ολιγοσακχαρίτης του μελιού, η παλατινόζη, καθυστερεί την απορρόφηση της γλυκόζης από το έντερο, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε μείωση της γλυκαιμίας (Ahmed et al., 2018). Ένας επιπρόσθετος προτεινόμενος μηχανισμός για την υπογλυκαιμική δράση του μελιού είναι ότι το μέλι ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Ειδικότερα, η ινσουλίνη, μέσω της πρόσδεσης της στον υποδοχέα της, ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt και έτσι διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς και τη σύνθεση

του γλυκογόνου. Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί πως η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα NF-κB, MAPK και φωσφορυλιωμένης IRS-1 στο κατάλοιπο σερίνης 307. Το μέλι, λοιπόν, αυξάνει την έκφραση της Akt κινάσης και μειώνει την έκφραση των NF-κB, MAPK και τη φωσφορυλίωση της IRS-1 στη σερίνη 307. Γι'αυτή τη δράση του μελιού είναι υπεύθυνα τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται σε αυτό, τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς μειώνουν το οξειδωτικό stress που αλλιώς θα ενεργοποιούσε τους παράγοντες που ευθύνονται για την αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη (Batumalaie et al., 2013).

1.5.4 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τα βασικά στοιχεία της σηματοδότησης της φλεγμονής είναι οι MAPK και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB που ενεργοποιούν διάφορους μεσολαβητές που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής. Το μέλι μειώνει τα επίπεδα των προφλεγμονωδών παραγόντων IL-6, TNF- α , PGE2, NO, iNOS και COX-2 στο πλάσμα του αίματος. Επιπλέον, εμποδίζει την μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή προφλεγμονωδών γονιδίων, ενώ αναστέλλει και την αποικοδόμηση του αναστολέα του NF-κB (IκB α), ώστε να παραμείνει ανενεργός ο NF-κB. Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα που εμπεριέχονται στο μέλι μπορούν να μειώσουν την δραστικότητα ενζύμων που συμμετέχουν στην φλεγμονή όπως είναι η κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2) και η επαγόμενη συνθάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS). Ακόμη, τα φλαβονοειδή του μελιού μειώνουν την έκφραση του φλεγμονώδους μεσολαβητή MMP-9, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει χρόνια φλεγμονή. Επίσης, η παραγωγή του H₂O₂ από το μέλι προωθεί την ανάπτυξη ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων, ώστε να επιδιορθώσουν τη ζημιά που προκλήθηκε λόγω της φλεγμονής. Τέλος, το μέλι εμποδίζει την απελευθέρωση μακροφάγων, μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων με αποτέλεσμα να μην παράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) και συνεπώς να παρεμποδίζεται η φλεγμονή. Η φλεγμονή, επίσης, μειώνεται μέσω της ελάττωσης της παραγωγής των κερατινοκυττάρων και των λευκοκυττάρων. (Ahmed et al., 2018).



Εικόνα 1.5.4.1: Οι μηχανισμοί της αντιφλεγμονώδους δράσης του μελιού.

1.5.5 Αντιβακτηριακή δράση

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες όπως το χαμηλό pH, η ωσμωτική επίδραση των σακχάρων, η παραγωγή H_2O_2 και σε άλλες ουσίες που υποστηρίζουν την αντιμικροβιακή δράση όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και η λυσοζύμη (Ahmed et al., 2018). Παρακάτω αναλύονται οι κυριότεροι παράγοντες που ευθύνονται για την αντιβακτηριακή δράση του μελιού.

Σάκχαρα και pH

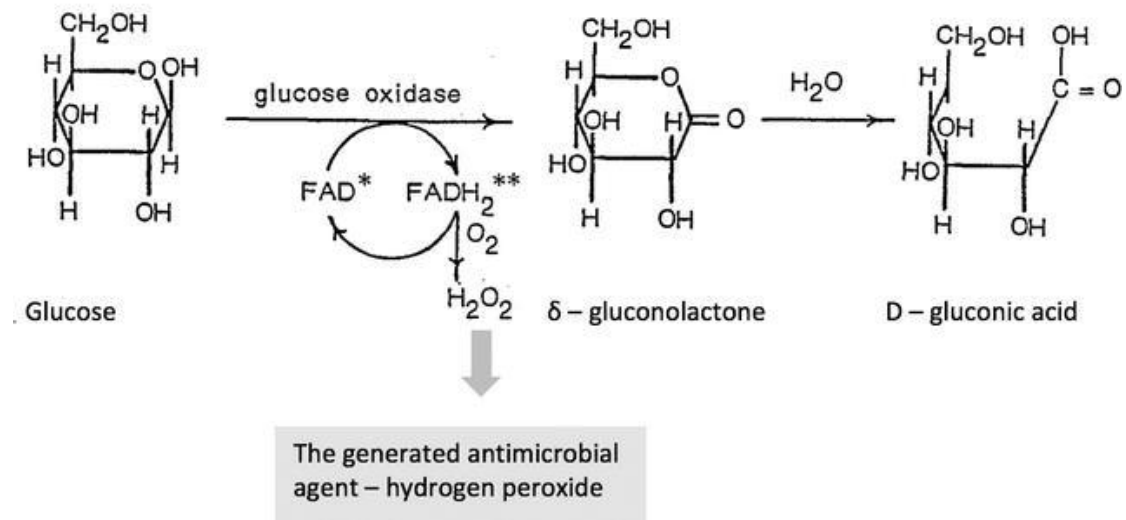
Τα σάκχαρα που συναντώνται στο μέλι και ειδικότερα η γλυκόζη και η φρουκτόζη δημιουργούν ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από αυξημένο stress λόγω του χαμηλού pH και της αυξημένης ωσμωτικής πίεσης που επικρατεί σε αυτό. Αυτές οι συνθήκες είναι ιδιαίτερα δυσμενείς για την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο μέλι (Nolan et al., 2019). Ειδικότερα, το pH του μελιού έχει εύρος από 3.2 έως 4.5, ενώ το ελάχιστο pH για ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων είναι για το *E. coli* 4.3, για τη *Salmonella* spp. 4.0, για το *P. aeruginosa* 4.4 και για το *S. pyogenes* 4.5. Επόμεως, το pH ενός μη αραιωμένου μελιού αποτελεί σημαντικό αντιβακτηριακό παράγοντα (Mandal et al., 2011).

Πολυφαινολικές ενώσεις

Οι πολυφαινολικές ενώσεις μεταφέρονται από το φυτό στο μέλι και έχουν αναγνωρισθεί ως ένα σημαντικό συστατικό που ευθύνεται για τις ευεργετικές του επιδράσεις του μελιού. Πιο συγκεκριμένα, οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την καταστροφή των ελεύθερων ριζών, για την αναστολή της οξειδωσης, ενώ φαίνεται να συμμετέχουν και στην παραγωγή του H_2O_2 (Nolan et al., 2019).

Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Η παρουσία του H_2O_2 στο μέλι θεωρείται ένας από τους κύριους αντιμικροβιακούς του παράγοντες. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται ως ένα παραπροϊόν της συλλογής του νέκταρος από τη μέλισσα *Apis mellifera*. Αφού συλλεχθεί το νέκταρ, γίνεται προσθήκη των ενζύμων διαστάση, ινβερτάση και οξειδάση της γλυκόζης σε αυτό. Η διαστάση και η ινβερτάση διασπούν τους ογκώδεις δισακχαρίτες όπως τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη και η οξειδάση της γλυκόζης, παρουσία οξυγόνου, οξειδώνει τη γλυκόζη σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη και H_2O_2 . Τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου διαφέρουν μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της οξειδάσης της γλυκόζης και την παρουσία καταλάσης, η οποία προήλθε από τη γύρη. Το H_2O_2 δρα απομακρύνοντας ηλεκτρόνια από χημικές ενώσεις, οδηγώντας, με αυτόν τον τρόπο, σε οξειδωση. Η οξειδωση προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης μικροβίων και μη αναστρέψιμη βλάβη στο DNA μέσω της παραγωγής ριζών υδροξυλίου. Τα επίπεδα του H_2O_2 κυμαίνονται από 0,5 έως 2,5 mM, ενώ η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για την αποικοδόμηση του DNA του *E.coli* είναι 2,7 mM. Γίνεται, σαφές, λοιπόν, πως το H_2O_2 δεν είναι ο μόνος αντιμικροβιακός παράγοντας του μελιού (Nolan et al., 2019).



Εικόνα 1.5.5.1: Η αντίδραση παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Μεθυλγλυοξάλη (MGO)

Η μεθυλγλυοξάλη (MGO) ανήκει στα 1,2-δικαρβονύλια και ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka. Η συγκέντρωση της μεθυλγλυοξάλης στο μέλι Manuka είναι αρκετά μεγαλύτερη απ'ότι σε άλλα είδη μελιού και σχηματίζεται από τη μετατροπή της διυδροξυακετόνης σε MGO μέσω της αντίδρασης Maillard. Όταν το μέλι συλλέγεται από τη κυψέλη περιέχει χαμηλή συγκέντρωση MGO και υψηλή διυδροξυακετόνης. Ωστόσο, μετά την αποθήκευση του μελιού, η κατάσταση αυτή αλλάζει και τα επίπεδα της μεθυλγλυοξάλης αυξάνονται λόγω της μετατροπής της διυδροξυακετόνης (Roberts et al., 2015). Η μεθυλγλυοξάλη αναστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών μέσω αναστολής του ενζύμου ουρεάση που έχει σαν ρόλο την παραγωγή αμμωνίας σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH, ώστε να διευκολυνθεί η προσαρμογή των βακτηρίων στο περιβάλλον και να επιτευχθεί η γρήγορη ανάπτυξή τους (Ahmed et al., 2018).

Bee defensin-1

Το bee-defensin-1 είναι ένα πεπτίδιο με αντιμικροβιακές ιδιότητες που έχει βρεθεί στην αιμολέμφο της μέλισσας και στους υποφαρυγγικούς της αδένες. Στη μέλισσα το

πεπτίδο αυτό δρά ως έμφυτη ανοσολογική απόκριση, με δράση έναντι μυκήτων, πρωτόζωων, Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων (Nolan et al., 2019).

Ιδιότητες καταστροφής βιοφίλμ

Τα βιοφίλμ δημιουργούνται μέσω της προσκόλλησης βακτηρίων σε μια επιφάνεια, οδηγώντας σε παραγωγή ενός εξωκυτταρικού στρώματος που προστατεύει την βακτηριακή κοινότητα, με το να εμποδίζει τη διείσδυση αντιμικροβιακών ενώσεων. Το μέλι αποδιοργανώνει τα βιοφίλμ λόγω διακοπής της αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (quorum sensing) και έχει την ικανότητα να τα διαπερνά (Nolan et al., 2019). Μελέτες έχουν δείξει πως το μέλι καταστρέφει αποτελεσματικά τα βιοφίλμ από είδη βακτηρίων όπως *P. Aeruginosa*, *S. Aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* κ.α. (Ahmed et al., 2018)

1.5.6 Αντιμυκητιακή δράση

Το μέλι παρουσιάζει υψηλή αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι διαφόρων ειδών μυκήτων όπως *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Microsporium gypseum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces* και *Malassezia*. Η δράση του αυτή οφείλεται κυρίως στην παρουσία της οξειδάσης της γλυκόζης, της μεθυλγλυοξάλης και της υψηλής του περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Η αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων συμβαίνει μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού βιοφίλμ, διάσπασης των ήδη σχηματισμένων βιοφίλμ και πρόκλησης αλλαγών στη δομή των εξωπολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα, το μέλι παραμορφώνει την ακεραιότητα της μεμβράνης, με αποτέλεσμα, τη συρρίκνωση της επιφάνειας των κυττάρων στο βιοφίλμ και τελικά την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων. Ακόμη, τα φλαβονοειδή του μελιού επιβραδύνουν την ανάπτυξη των μυκήτων, επηρεάζουν την εξωτερική τους μορφολογία και την ακεραιότητα της μεμβράνης τους, ενώ επίσης διαταράσσουν κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκονται στη δημιουργία βλαστικών σωληνών (Ahmed et al., 2018).

1.5.7 Αντιϊκή δράση

Οι αντιϊκές ιδιότητες του μελιού αποδίδονται στα διάφορα συστατικά του που έχουν βρεθεί ότι ελέγχουν την ανάπτυξη ιογενών αλλοιώσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο χαλκός, ένα από τα ιχνοστοιχεία που έχουν βρεθεί στο μέλι, ο οποίος έχει την ιδιότητα αδρανοποιεί τον ιό. Επιπροσθέτως, η παρουσία ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και φλαβονοειδών καθώς και η παραγωγή H_2O_2 οδηγούν σε αναστολή της ιικής ανάπτυξης μέσω παρεμπόδισης της μεταγραφής και της μετάφρασης του ιού (Ahmed et al., 2018).

Η αντιϊκή δράση του μελιού έχει αποδειχθεί έναντι πολλών τύπων ιών. Αναλυτικότερα, διάφορες *in vitro* μελέτες, έχουν δείξει την αντιϊκή δράση του μελιού έναντι ιών όπως *Rubella*, *herpes simplex* και *varicella zoster viruses* (Al-Walili, 2004; Zeina et al., 1996; Shahzad et al., 2012). Επιπλέον, το μέλι φαίνεται να έχει και αντιϊκή δράση έναντι του ιού της γρίπης. Οι παράγοντες του μελιού που έχουν προταθεί πως ευθύνονται κατά ένα μέρος για την αντιϊκή του δράση έναντι του ιού της γρίπης είναι τα φλαβονοειδή ρουτοσίδη και 5,7-διυδροξυφλαβόνη (chrysin) (Watanabe et al., 2014).

Ακόμη, είναι γνωστό ότι το μέλι περιλαμβάνει εκκρίσεις από τους σιελογόνους και τους φαρυγγικούς αδένες των μελισσών. Στους σιελογόνους αδένες των μελισσών συναντώνται ενώσεις όπως το οξειδίο του αζώτου (NO), τα νιτρώδη (NO_2^-) και τα νιτρικά (NO_3^-), οι οποίες διεγείρουν την άμυνα του ξενιστή έναντι DNA και RNA ιών, όπως οι πολιοϊοί, ο ιός της Ιαπωνικής εγκαφλίτιδας, ο ιός του απλού έρπητα τύπου 1, ο ιός Έπσταϊν-Μπαρ κ.α. Πιο συγκεκριμένα το NO καθυστερεί την ανάπτυξη ιογενών αλλοιώσεων και αναστέλλει την αντιγραφή των ιών, καθώς παρεμβαίνει στην πολυμεράση του ιού, στο γενετικό του υλικό ή/και στις καψιδιακές του πρωτεΐνες. Το NO λειτουργεί σαν αντικός παράγοντας και μέσα στον οργανισμό σαν ενδογενές μόριο. Η παραγωγή του επάγεται είτε από τον ίδιο τον ιό που προσβάλλει το κύτταρο, είτε έμμεσα μέσω της ιντερφερόνης γ. Ειδικότερα, η ιντερφερόνη γ αποτελεί μέρος της αρχικής, μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης του κυττάρου, η οποία θα οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO μέσω της iNOS. Στη συνέχεια το NO περνά στα γειτονικά κύτταρα και προσφέρει μια αρχική άμυνα στον οργανισμό έναντι της ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, παρά την προστασία που προσφέρει το NO σε ικές μολύνσεις, ορισμένες έρευνες έχουν δείξει πως το οξειδίο του αζώτου και τα παράγωγά του μπορούν να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στον οργανισμό (Torre et al., 2002).

Επιπλέον, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα φλαβονοειδή αποτελούν ένα ακόμη συστατικό του μελιού που έχει την ικανότητα να αναστέλλει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιού (Ahmed et al., 2018). Θα μπορούσε συνεπώς το μέλι να χρησιμοποιηθεί σαν φυσικό φάρμακο για τη θεραπεία ικών μολύνσεων όπως αυτή που προκαλούν οι εντεροϊοί, όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμα αντικαταστάσιμα φάρμακα.

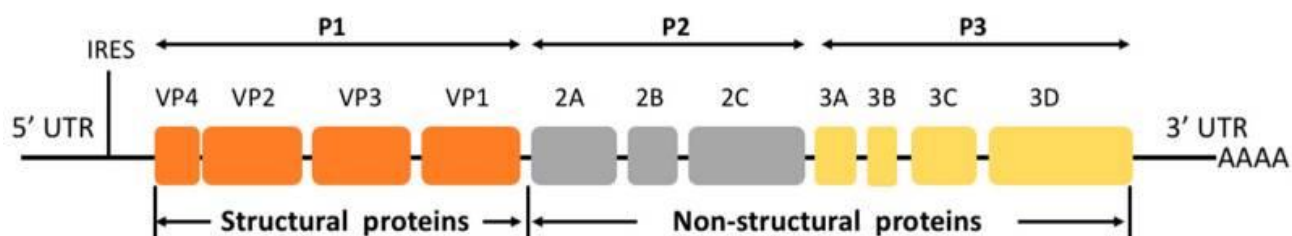
1.6 Εντεροϊοί

Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει τέσσερα είδη ανθρώπινων εντεροϊών (A-D), όκτω είδη εντεροϊών των θηλαστικών (E-L) και τρία είδη ρινοϊών. Πριν την κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων εντεροϊών σε A-D, είχε γίνει κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με την παθογένεσή τους σε πολιοϊούς, Coxsackie A και Coxsackie B ιούς και σε ιούς Echo. Οι εντεροϊοί έχουν εικοσαεδρική συμμετρία, διαθέτουν ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας ως γενετικό υλικό, μήκους περίπου 7.6kb και δεν περιέχουν λιπιδικό φάκελο. Το γονιδίωμα τους περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), που κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία αρχικά διασπάται στις P1, P2, P3 και στη συνέχεια κόβεται από τις πρωτεάσες 2A και 3C, ώστε να προκύψουν τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, οι VP1-VP4 και επτά λειτουργικές, οι 2A-2C και 3A-3D πρωτεΐνες. Ανοδικά και καθοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης βρίσκονται οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές, αντίστοιχα. Η 5' αμετάφραστη περιοχή περιλαμβάνει μια δόμη που μοιάζει με τριφύλλι και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σταθερότητα του γενετικού υλικού κατά τη μεταγραφή. Επιπλέον, περιέχει και μια δομή IRES (internal ribosome entry site), η οποία προωθεί την μετάφραση του ιικού RNA μέσω στρατολόγησης του ριβοσώματος (Sun et al., 2019).

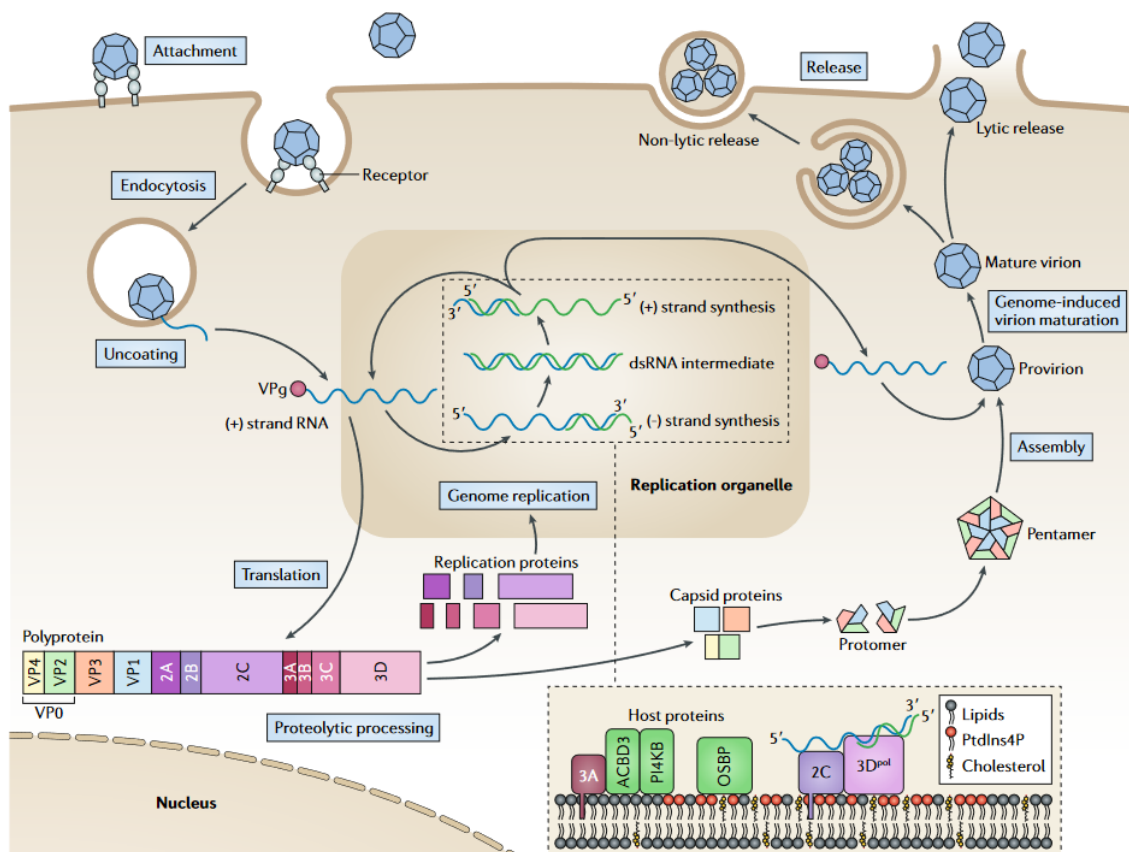
1.6.1 Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ξεκινά με την πρόσδεσή τους σε υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων και την είσοδο του στο κυτταρόπλασμα μέσω ενδοκύττωσης. Με αυτόν τον τρόπο, προκαλείται ένας καταρράκτης αλλαγών στη διαμόρφωση του ιού, με τελικό αποτέλεσμα την αποδιάταξη του καψιδίου και την

απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου στόχου (Liu et al., 2015). Στη συνέχεια, το ιικό RNA θετικής πολικότητας λειτουργεί ως αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και μεταφράζεται, μέσω των κυτταρικών μηχανισμών σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται από τις πρωτεάσες 2A και 3C στις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Το ιικό RNA, χρησιμοποιείται επίσης ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}. Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά οργανίδια (Replication Organelles), που αποτελούν δομές της μεμβράνης. Ο νεοσυντιθέμενος αρνητικός κλώνος χρησιμοποιείται, στη συνέχεια, για την επανασύνθεση του RNA θετικής πολικότητας, που είτε θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για περαιτέρω μετάφραση και αντιγραφή είτε θα πακεταριστεί στα νέα ιοσωμάτια που προέκυψαν από τη συναρμολόγηση του ιικού καψιδίου. Η συναρμολόγηση πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού πρωτομερών των πρωτεϊνών VP0 και VP1, VP3. Τα πρωτομερή αποτελούν ενδιάμεσο προϊόν της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου και περιλαμβάνουν από ένα αντίγραφο των VP0, VP1 και VP3. Αφού γίνει αυτό, πέντε πρωτομερή θα σχηματίσουν ένα πενταμερές και δώδεκα πενταμερή θα σχηματίσουν το προκαψίδιο, το οποίο θα μετατραπεί σε ώριμο καψίδιο μέσω της επεξεργασίας της VP0, σε VP2 και VP4. Τέλος, τα ιοσωμάτια, απελευθερώνονται από το κύτταρο μέσω εξωκυττάρωσης ή λύσης του κυτάρου (Baggen et al., 2018).



Εικόνα 1.6.1.1: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος των εντεροϊών.



Εικόνα 1.6.1.2: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των εντεροϊών.

1.6.2 Παθογένεση και επιδημιολογία

Εντεροϊός EV-D68

Ο ανθρώπινος εντεροϊός EV-D68 είναι ένας ιός που προκαλεί μόλυνση της αναπνευστικής οδού και αποτελεί μέλος της ομάδας D των εντεροϊών που ανήκουν στην οικογένεια των *Picornaviridae*. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς που είναι ανθεκτικοί στο οξικό περιβάλλον και αντιγράφονται στη γαστρεντερική οδό, ο εντεροϊός EV-D68 είναι ευάλωτος στο οξικό περιβάλλον και αντιγράφεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες στο αναπνευστικό σύστημα, όπως και οι ρινοϊοί, προκαλώντας συμπτώματα όπως βήχα, δύσπνοια και συριγμό (Sun et al., 2019). Γενικά, ο εντεροϊός EV-D68 μπορεί να προκαλέσει είτε ήπια προς σοβαρή ασθένεια του αναπνευστικού συστήματος είτε και να περάσει ασυμπτωματικά. Άτομα μικρής ηλικίας που είναι πιθανόν να μην έχουν έρθει σε επαφή με εντεροϊό στο παρελθόν, θα

εμφανίσουν ήπια ή σοβαρή ασθένεια μετά από μόλυνση από τον εντεροϊό. Από την άλλη πλευρά, οι ενήλικες που έχουν μολυνθεί από τον ιό στο παρελθόν, είναι αρκετά πιθανό να εμφανίσουν ήπια έως και καθόλου συμπτώματα μόλυνσης. Ο ιός βρίσκεται στο σάλιο, στη ρινική βλέννα και στα πτύελα του μολυσμένου ανθρώπου και μπορεί να μεταδοθεί από το ένα άτομο στο άλλο μέσω του βήχα, του φταρνίσματος ή μέσω αγγίγματος κάποιας επιφάνειας που έχει προηγουμένως αγγίξει ένα μολυσμένο άτομο (Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο εντεροϊός EV-D68 συσχετίζεται και με την εκδήλωση οξείας χαλαρής παράλυσης που αποτελεί νευρολογική διαταραχή. Κατά την οξεία χαλαρή παράλυση εμφανίζεται καταστροφή των κινητικών νευρώνων και παράλυση ενός ή περισσότερων άκρων. Οι υποψίες για αυτήν τη σχέση τέθηκαν κατά την έξαρση του εντεροϊού D68 το 2014 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, κατά την οποία υπήρξε και ραγδαία αύξηση κρουσμάτων οξείας χαλαρής παράλυσης.

Στον κόσμο κυκλοφορούν τουλάχιστον τρεις κλάδοι του εντεροϊού EV-D68 (A-C), που προέκυψαν από τη γενετική ποικιλομορφία της πρωτεΐνης VP1 (Tokarz et al., 2012). Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο του 2014, οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής είχαν έξαρση του ιού σε όλη την επικράτεια, με συμπτώματα σοβαρής αναπνευστικής ασθένειας. Από τον Αύγουστο του 2014, μέχρι τον Ιανουάριο του 2015 επιβεβαιώθηκαν 1395 κρούσματα Εντεροϊού EV-D68 με αναπνευστική ασθένεια, με σχεδόν όλα από αυτά να είναι σε παιδιά. Επιπλέον, θεωρείται πως υπήρχαν χιλιάδες κρούσματα εντεροϊού EV-D68 σε άτομα που δεν αναζήτησαν θεραπεία ή διάγνωση λόγω εμφάνισης ήπιων συμπτωμάτων (Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Εντεροϊός EV-A71

Η μόλυνση από τον Εντεροϊό EV-A71, που ανήκει στην ομάδα A των εντεροϊών, μπορεί να είναι είτε ασυμπτωματική είτε να προκαλέσει συμπτώματα όπως αυτά της νόσου των χεριών, ποδιών και στόματος, η οποία είναι ιδιαίτερα μεταδοτική. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος ιός μπορεί να μολύνει το νευρικό σύστημα., προκαλώντας ασθένειες όπως μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή μυελίτιδα και μπορεί να μολύνει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων με διαφορετική ικανότητα αντιγραφής σε αυτά. Ο εντεροϊός EV-A71 βρίσκεται κυρίως στο σάλιο, στη ρινική βλέννα και στα πτύελα του μολυσμένου ατόμου και μεταδίδεται κατά κύριο λόγο μέσω της κοπρανοστοματικής

οδού, αλλά και μέσω επαφής με τις στοματικές εκκρίσεις του ατόμου που έχει μολυνθεί από το συγκεκριμένο ιό (Puenpa et al., 2019).

Ιοί Coxsackie B - Εντεροϊός CVB5

Ο εντεροϊός CVB5 ανήκει στους ιούς Coxsackie της ομάδας B, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ένα μεγάλο εύρος ασθενειών, όπως γαστρεντερικές ασθένειες, μυοκαρδίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και ηπατίτιδα. Οι ιοί Coxsackie της ομάδας B, επιπλέον, έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν καταστροφή του νευρικού ιστού και συνεπώς να οδηγήσουν σε σπαστική παράλυση. Ο ιός αυτοί αρχικά αντιγράφονται στην άνω αεροφόρο οδό και μεταδίδονται από το ένα άτομο στο άλλο κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μέσω εκκρίσεων του αναπνευστικού συστήματος. Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο ιός βρίσκεται στην αεροφόρο οδό του μολυσμένου ατόμου, ενώ στα μετέπειτα στάδια μπορεί να βρεθεί στα κόπρανά του. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συγκεκριμένων ιών και των υποδοχέων τους καθορίζει την τοποθεσία της αρχικής μόλυνσης αλλά επηρεάζει και την μετάδοση του ιού στα υπόλοιπα όργανα, στα μετέπειτα στάδια της μόλυνσης (Tariq & Kyriakopoulos, 2020).

Εντεροϊός Sabin 1

Η πολιομυελίτιδα είναι μια ιδιαίτερα μολυσματική ασθένεια που προκαλείται από ιούς που ανήκουν στην οικογένεια των *Picornaviridae*. Τα κλινικά συμπτώματα διαφέρουν από αναπνευστικές ασθένειες και γαστρεντερίτιδα σε σοβαρές περιπτώσεις παράλυσης. Η πολιομυελίτιδα έφτασε επίπεδα επιδημίας στις αρχές του 20^{ου} αιώνα σε χώρες με υψηλό επίπεδο διαβίωσης. Η μόλυνση με πολιοϊό συμβαίνει κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μπορεί να περιοριστεί στο έντερο από αντισώματα που προέρχονται είτε από το εμβόλιο, είτε από προηγούμενες μολύνσεις ή είναι μητρικά. Για τον περιορισμό της πολιομυελίτιδας χρησιμοποιήθηκαν αποτελεσματικά εξασθενημένα ζωντανά στελέχη πολιοϊών που πήραν το όνομά τους από τον ερευνητή που τα ανέπτυξε, Sabin. Τα στελέχη αυτά συνέβαλαν ιδιαίτερα σημαντικά στον περιορισμό της εξάπλωσης της πολιομυελίτιδας, όμως υπήρχαν και κάποια περιστατικά παραλυτικής πολιομυελίτιδας που προέκυψαν λόγω μετατροπής του

εξασθενημένου στελέχους πίσω στον παθογονικό του φαινότυπο (Rezapkin et al., 1994).

1.6.3 Αντικατά φάρμακα για εντεροϊούς

Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αποτελεσματικά και αποδεκτά αντικατά φάρμακα ή εμβόλια για την καταπολέμηση μολύνσεων από τους Εντεροϊούς EV-D68, EV-A71 και CVB5. Ο κυβερνητικός οργανισμός των Ηνωμένων Πολιτειών CDC (Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών) πραγματοποίησε δοκιμές 16 φαρμάκων για την ιδιότητα τους να λειτουργήσουν ως πιθανά φάρμακα για την καταπολέμηση των μολύνσεων από τον Εντεροϊό EV-D68. Από αυτά, τα V-7404 και DAS181 έδειξαν σημαντική ανασταλτική ικανότητα του ιού. Το φάρμακο V7404 λειτουργεί ως αναστολέας της πρωτεάσης των εντεροϊών και των ρινοϊών, ενώ το DAS181 που αναπτύχθηκε για την καταπολέμηση των ιών της γρίπης και της παραγρίπης, μπορεί να αναστείλει τη μόλυνση μέσω καταστροφής των υποδοχέων σιαλικού οξέος από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος (Zenilman et al., 2015), (Esposito et al., 2015). Άλλα φάρμακα που είναι πιθανοί αναστολείς των εν λόγω εντεροϊών μπορεί να είναι καψιδιακοί αναστολείς που εμποδίζουν την πρόσδεση στους υποδοχείς, και αναστολείς των λειτουργικών πρωτεϊνών των εντεροϊών (Lin et al., 2019). Η έλλειψη φαρμάκων και εμβολίων για τη μόλυνση από εντεροϊούς τονίζουν τη σημασία του μελιού ως ένα φάρμακο της φύσης για την καταπολέμηση ιικών ασθενειών.

2. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιϊκής δράσης δώδεκα ελληνικών τύπων μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας και διαφορετική βοτανική προέλευση έναντι των εντεροϊών EV-D68, EV-A71, CVB5, Sabin 1 αλλά και της τοξικότητάς τους έναντι της κυτταρικής σειράς Rd. Η αντιική τους δράση συγκρίθηκε με την αντίστοιχη δραστηριότητα του μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την αντιική και αντιμικροβιακή του δράση.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Δείγματα μελιού

3.1.1 Ελληνικά δείγματα μελιού

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εξέταση 12 δειγμάτων ελληνικών τύπων μελιού με διαφορετική γεωγραφική και βοτανική προέλευση. Από τα 12 δείγματα που μελετήθηκαν, 4 προήλθαν από θυμάρι, 4 από πεύκο, 1 από ερείκη, 1 από καστανιά, 1 από βαμβάκι και 1 από ελάτη. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου.

Τύπος μελιού	Γεωγραφική προέλευση	Ημερομηνία Συγκομιδής
Πεύκου	Χαλκιδική	Αυγουστος 2019
Πεύκου	Θάσος	Ιούλιος 2019
Πεύκου	Ρόδος	Αύγουστος 2019
Πεύκου	Ηράκλειο	Οκτώβριος 2019
Θυμαρίσιο	Χάνια	Ιούλιος 2019
Θυμαρίσιο	Χίος	Αύγουστος 2019
Θυμαρίσιο	Κεφαλονιά	Αύγουστος 2019
Θυμαρίσιο	Κάλυμνος	Ιούνιος 2019
Ερείκης	Άνδρος	Μάιος 2019
Καστανιάς	Άγιο Όρος	Ιούλιος 2019
Ελάτου	Κορινθία	Ιούλιος 2019
Βαμβακιού	Λάρισα	Αύγουστος 2019

Πίνακας 3.1.1.1: Δείγματα ελληνικών τύπων μελιού, η γεωγραφική τους προέλευση και η ημερομηνία συγκομιδής τους.

3.1.2 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι της εταιρείας Steens™ και προέρχεται από το Βόρειο Νησί της Νέας Ζηλανδίας. Το συγκεκριμένο δείγμα μελιού Manuka έχει UMF 24+ που αντιστοιχεί σε τιμή MGO 1122+, κάνοντας το ένα από τα πιο ισχυρά δείγματα μελιού Manuka στον πλανήτη, καθώς οι παραπάνω τιμές είναι από τις υψηλότερες στην αγορά. Η αντική δράση των ελληνικών τύπων μελιού συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αντική δράση του μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς για την αντική του ικανότητα.

3.2 Καλλιέργεια των κυττάρων

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων μελιού και της αντικής τους δράσης ήταν η κυτταρική σειρά Rd (Rhabdomyosarcoma (ATCC® CCL-136™)) που αγοράστηκε από την εταιρεία American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, U.S.A).

Τα κύτταρα Rd προστίθονταν μαζί με το κατάλληλο θρεπτικό τους υλικό DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biosera) με 2% βόειο ορό και 1X Antibiotic-Antimycotic (Biosera) σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιεργειών 25cc, οι οποίες στη συνέχεια επωάζονταν σε κλίβανο στους 37°C. Τα κύτταρα τοποθετούνταν καθημερινώς σε ανάστροφο μικροσκόπιο διέλευσης φωτός για να διερευνηθεί η κάλυψη της επιφάνειας της φιάλης από κύτταρα. Όταν η επιφάνεια της πλαστικής φιάλης κυτταροκαλλιεργειών ήταν κατά 85 - 90% πλήρης, πραγματοποιούνταν ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων Rd. Κατά τη διαδικασία αυτή, αρχικά γινόταν απόρριψη του θρεπτικού μέσου από την πλαστική φιάλη και ακολουθούσε η προσθήκη διαλύματος θρυψίνης – EDTA, ήπια ανάδευση και τελικά αποβολή του διαλύματος από τη φιάλη. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν μια δεύτερη διαδοχική πλύση με θρυψίνη – EDTA και επώαση της φιάλης για 5 λεπτά σε κλίβανο στους 37 °C, ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης. Έπειτα, τα αποκολλημένα, πλέον, κύτταρα επαναδιαλύονταν σε νέο θρεπτικό μέσο DMEM με 2% βόειο ορό, με πολλαπλές αναδεύσεις με τη χρήση πιπέτας ώστε να μαζευτούν τα

κύτταρα σε ένα εναιώρημα στον πάτο της φιάλης. Η συνολική ποσότητα του εναιωρήματος λαμβάνονταν με τη πιπέτα και μοιράζονταν ισόποσα στην ίδια και σε μία νέα πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιιεργειών 25cc. Τέλος, ακολουθούσε η προσθήκη επιπλέον θρεπτικού μέσου DMEM 2% και στις δύο φιάλες έως ότου το περιεχόμενο της κάθε φιάλης φτάσει τα 10 ml και η επώαση τους στους σε κλίβανο στους 37 °C.

3.3 Πειραματικό υκό στέλεχος

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα υκά στελέχη:

- Enterovirus EV-D68, Στέλεχος Fermon (California/62) – RIVM (The Netherlands)
- Coxsackievirus B5, Στέλεχος Faulkner (Kentucky)
- Enterovirus EV-A71, Στέλεχος BrCr (California)
- PV1: Sabin, Στέλεχος LSc/2ab.

Τα συγκεκριμένα στελέχη προέρχονται από την American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, U.S.A.) και όλοι οι χειρισμοί τους πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες βιοασφάλειας επιπέδου 2.

3.4 Μόλυνση κυττάρων και καλλιέργεια των ιών

Οι ιοί καλλιεργήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες κυτταροκαλλιιεργειών Rd, παρουσία του θρεπτικού υλικού D-MEM. Αρχικά, έγινε προσθήκη 200μl από το εκάστοτε στέλεχος εντεροϊού στους αντίστοιχους σωλήνες τους και στη συνέχεια επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 °C. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας της κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού (CPE), ένας σωλήνας CC που αντιστοιχεί σε μη μολυσμένα κύτταρα Rd. Στο επόμενο βήμα, οι σωλήνες παρατηρούνταν καθημερινά για την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, ενώ πραγματοποιήθηκαν πολλές ανακαλλιέργειες του ιού, ώστε να υπάρξει αύξηση του

ικού τίτλου. Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε μέχρι να παρατηρηθεί πλήρης καταστροφή των κυττάρων στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση.

3.5 Μέτρηση ιικού τίτλου

Για τη μέτρηση του ιικού τίτλου του εκάστοτε εντεροϊού, σχηματίστηκαν σειριακές αραιώσεις του καθενός ιού από 10^{-1} έως 10^{-8} , ξεκινώντας από τη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια του σωλήνα. Αρχικά, σε κάθε θέσης πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, προστέθηκαν 100μl κυτταροκαλλιέργειας Rd και ακολούθησε επώαση της πλάκας σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες, με στόχο την προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα των βοθρίων της πλάκας. Στη συνέχεια, ενοφθαλμίστηκαν 100μl από κάθε αραιώση (10^{-1} έως 10^{-8}) στις αντίστοιχες σειρές της πλάκας μικροτιτλοποίησης και ακολούθησε επώαση της πλάκας στους 37°C , μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων στον αρνητικό μάρτυρα (C.C: cell control).

Το επόμενο βήμα, ήταν η μέτρηση του ιικού τίτλου σε CCID₅₀ / 0.1 ml. Ως CCID₅₀ ορίζεται την ποσότητα του ιού που προκαλεί καταστροφή στο 50% των κυττάρων. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του ιικού τίτλου του ιού στην αρχική φλάσκα ήταν:

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

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

Μέσω του παραπάνω τύπου επιλέχθηκε ο ιικός τίτλος που αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που προκαλεί καταστροφή 4+ στις 48 ώρες μετά την προσθήκη του ιού στα κύτταρα Rd.

3.6 Αραιώσεις δειγμάτων μελιού και εξέταση της τοξικότητάς τους

Συνολικά εξετάστηκαν 12 δείγματα ελληνικών τύπων μελιών ως προς την τοξικότητα τους έναντι της κυτταρικής σειράς Rd, η οποία στη συνέχεια συγκρίθηκε με την αντίστοιχη τοξικότητα του μελιού Manuka. Για τον έλεγχο της τοξικότητας, έγινε, αρχικά, επίστρωση κυττάρων Rd σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων, παρουσία DMEM 2% και επώασή της σε κλίβανο στους 37 °C για 24 ώρες, με τη 12^η στήλη να παραμένει κενή, δίχως κύτταρα, για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως blank (τυφλό). Μετά το πέρας των 24 ωρών, έγινε προετοιμασία των δειγμάτων μελιού. Για κάθε δείγμα μελιού, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 124 mg/ml, 68 mg/ml, 32 mg/ml, 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml. Οι αραιώσεις των διάφορων δειγμάτων μελιού έγιναν με τη διαλυτοποίηση του μελιού σε συγκεκριμένη ποσότητα του θρεπτικού υλικού D-MEM χωρίς βόειο ορό, που αναλογεί για κάθε συγκέντρωση. Στη συνέχεια, έγινε απόρριψη του θρεπτικού από την πλάκα 96 θέσεων και συμπλήρωση της στήλης 11 με DMEM, ώστε να αποτελέσει το θετικό μάρτυρα του πειράματος. Έτσι, η κάθε πλάκα είχε μια στήλη θετικού control με κύτταρα Rd σε θρεπτικό μεσο DMEM και μια στήλη μόνο με θρεπτικό υλικό DMEM που λειτουργούσε ως blank για τη μετέπειτα διαδικασία μέτρησης απορρόφησης. Τέλος, έγινε προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων μελιού στις αντίστοιχες θέσεις τους και η πλάκα επώαστηκε στους 37 °C για 24 ώρες.

3.6.1 Δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με MTT

Μετά την 24ώρη επώαση των κυττάρων Rd με τις διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού, μετρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μέσω προσθήκης του αντιδραστηρίου MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στη μετατροπή του διαλυτού κίτρινου άλατος τετραζολίου σε κρυστάλλους φορμαζάνης που έχουν σκούρο μωβ χρώμα. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων και αποτελεί ένδειξη μιτοχονδριακής δραστηριότητας. Έτσι, εφόσον για τους περισσότερους κυτταρικούς πληθυσμούς η συνολική μιτοχονδριακή τους δραστηριότητα είναι ανάλογη του

αριθμού των ζωντανών κυττάρων, η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η κυτταροτοξική δράση του μελιού στα κύτταρα Rd (van Merloo et al., 2011).

Για να γίνει η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων, προστέθηκαν σε κάθε βοθρίο 10μl MTT συγκέντρωσης 5mg/ml. Στη συνέχεια, η πλάκα επωάζεται στους 37°C, σε σκιερό μέρος, για 180 λεπτά, ώστε να σχηματισούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, προστίθενται 100μl από τον διαλύτη του MTT (SDS+HCl) σε κάθε βοθρίο της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης. Τέλος, η πλάκα τοποθετείται σε plate reader, ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση του κάθε βοθρίου στα 570 nm. Γενικά, όσο πιο ύψηλη είναι η τιμή της απορρόφησης του κάθε βοθρίου, τόσο πιο υψηλός και ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων που περιέχει. Από τις τιμές απορρόφησης που θα προκύψουν, υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση με τον τύπο:

% βιωσιμότητα

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

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

Εικόνα 3.6.1.1: Αναπαράσταση της διάταξης της πλάκας μικροτιτλοποίησης για τη μέτρηση της τοξικότητας του μελιού. Αριστερά φαίνονται οι τιμές των συγκεντρώσεων των δύο τύπων μελιού. Για κάθε συγκέντρωση, κάθε τύπου μελιού, χρησιμοποιούνται πέντε βοθρία. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 10μl MTT. Μέλι A: βοθρία 1-5, Μέλι B: βοθρία 6-10, C.C.: στήλη 11, BLANK: στήλη 12. Όπου C.C. αντιστοιχεί σε κύτταρα Rd με θρεπτικό υλικό D-MEM και BLANK = DMEM.

3.6.2 Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC₅₀)

Ως CC₅₀ ορίζουμε τη συγκέντρωση μιας ουσίας, στη συγκεκριμένη περίπτωση του μελιού, που μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 50% (Hara et al., 2018). Για τον υπολογισμό της τιμής CC₅₀ του κάθε τύπου μελιού έναντι των κυττάρων Rd, χρησιμοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με MTT. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν για τις διάφορες συγκεντρώσεις του μελιού (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 mg/ml), χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μια γραφικής παράστασης Απορρόφησης – Συγκέντρωσης (μελιού), από την εξίσωση της οποίας, βρέθηκε η τιμή CC₅₀, όπου και παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων.

3.7 Μελέτη αντιακτικής δράσης δειγμάτων μελιού

. Η αντιακτική δράση του κάθε μελιού μετρείται ως ικανότητα παρεμπόδισης της καταστροφής των κυττάρων Rd από τον ιό. Για τη μελέτη της αντιακτικής δράσης των διάφορων τύπων μελιού, αρχικά επιστρώθηκε μια πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με κύτταρα Rd σε DMEM 2% και επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Από το προηγούμενο πείραμα κυτταροτοξικότητας του μελιού, βρέθηκε πως οι συγκεντρώσεις 128, 64 και 32 mg/ml είναι τοξικές για την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Επομένως, οι αραιώσεις 16, 8, 4, 2, 1 mg/ml του μελιού σε DMEM ήταν κυρίως αυτές που εξετάστηκαν για αντιακτική δράση. Σε κάθε αραιώση προστέθηκε ισόποσος όγκος ιού συγκέντρωσης που μπορεί να προκαλέσει πλήρη καταστροφή στα κύτταρα μέσα σε 48 ώρες μετά τη μόλυνση και οι αραιώσεις του μελιού με τον ιό που παρασκευάστηκαν τοποθετήθηκαν στο κλίβανο στους 37°C και επώαστηκαν εκεί για μία ώρα.

Μετά τη μία ώρα επώασης, ενοφθαλμίστηκαν 200μl από κάθε μίγμα αραιώσης μελιού με ιό και D-MEM στις αντίστοιχες θέσεις τους στην πλάκα μικροτιτλοποίησης που περιείχε τα κύτταρα Rd. Για το Μέλι Α χρησιμοποιήθηκαν τα βοθρία 1 – 5 κάθε σειράς, ενώ για το Μέλι Β τα βοθρία 6 – 10. Οι διάφορες συγκεντρώσεις ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα με σειρά από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη. Η στήλη 11 χρησιμοποιήθηκε ως V.C. (Virus Control), στην οποία προστέθηκαν 200μl από ιό συγκέντρωσης τέτοιας που προκαλεί πλήρη καταστροφή των κυττάρων σε 48 ώρες, ενώ η στήλη 12 αντιστοιχεί στο C.C. (Cell Control) που περιέχει μόνο κύτταρα Rd σε 200μl D-MEM. Αφού έγινε η ετοιμασία της πλάκας, ακολούθησε η επώαση της στους 37°C και η παρακολούθηση της καθημερινώς για την εμφάνιση αντιακτικής δράσης, μέχρι και την ολική καταστροφή των κυττάρων στη στήλη του V.C. Η καταστροφή των κυττάρων Rd εξαιτίας του ιού ή/και της τοξικότητας του μελιού εξετάστηκε ως προς τη δημιουργία κυτταροπαθογόνου φαινομένου (Cytopathogenic Effect, CPE). Ειδικότερα, η καταστροφή του 25% των κυττάρων σε κάθε βοθρίο, ερμηνεύτηκε ως CPE 1+. Αντίστοιχα, η καταστροφή του 50% των κυττάρων σημειώθηκε ως CPE 2+, η καταστροφή του 75% αντιστοιχούσε σε CPE 3+ και η 100% (πλήρης) καταστροφή ως CPE 4+. Μετά το τέλος της μέτρησης η πλάκα τοποθετήθηκε στους -20° C και 24 ώρες αργότερα, τα δείγματα συλλέχθηκαν σε eppendorfs των 2ml έτσι ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού των εντεροϊών.

3.8 Απομόνωση ιικού DNA

Για την απομόνωση του RNA των εντεροϊών και του DNA των κυττάρων Rd, χρησιμοποιήθηκαν eppendorf χωρητικότητας 2ml. Σε αυτά προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου συγκέντρωσης 5 mg/ml, 300μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate) και 100μl από την εκάστοτε ιική καλλιέργεια, αφού είχε προηγηθεί η ανάδευση της στο vortex. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος και επώαση του σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθησε η προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C), η ανάδευση των eppendorf και η τοποθέτησή τους στους -20 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14000 rcf και απόρριψη του υπερκειμένου που σχηματίστηκε. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 500μl αιθανόλης 70% και ακολούθησε η ανάδευση των δειγμάτων και η φυγοκέντρησή τους για 10 λεπτά στα 14000 rcf. Τέλος, έγινε απόρριψη του υπερκειμένου, επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 100μl ddH₂O, ανάδευση των δειγμάτων σε vortex και αποθήκευση των δειγμάτων στους -20 °C.

3.9 Αντίστροφη μεταγραφή

Ο εντεροϊοί διαθέτουν μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας ως γενετικό υλικό. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η μετατροπή του RNA σε DNA, ώστε να γίνει ποσοτικοποίηση των ιικών αντιγράφων. Η διαδικασία μετατροπής του RNA σε DNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός μονόκλωνου cDNA μορίου, το οποίο στη συνέχεια θα αποτελέσει υπόστρωμα για τη DNA πολυμέραση, ώστε να συντεθεί τελικά ένα δίκλωνο DNA μόριο.

Για την αντίστροφη μεταγραφή, χρησιμοποιήθηκε ένας universal antisense εκκινητής που στοχεύει στη συντηρημένη 5' αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών. Η αλληλουχία του εκκινητή ήταν η εξής:

5'–TTGTCACCATAACCAGCCA–3' (Guillot et al., 2000)

Για την πραγματοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής, αρχικά, ετοιμάζεται το μίγμα 1 (M1) που περιλαμβάνει για κάθε αντίδραση: 5pmol antisense εκκινητή, 40mM

dNTPs, 4μl ddH₂O. Στη συνέχεια, 7μl από το μίγμα προστίθενται σε Eppendorf των 0.5ml μαζί με 5μl του εκχυλισμένου RNA του κάθε δείγματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και επώαση των δειγμάτων στους 65 °C για πέντε λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf-Mastercycler, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA. Κατόπιν, το κάθε δείγμα τοποθετείται στον πάγο και ξεκινά η προετοιμασία του μίγματος 2 (M2) που περιλαμβάνει: 1X FastGene Buffer, 0.01mM DTT, 100U RT FastGene Scriptase II NIPPON Genetics και 1.5μl ddH₂O. Τέλος, 8μl από το μίγμα 2, προστίθενται σε κάθε δείγμα RNA/M1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση και δύο διαδοχικές επώσεις, η 1^η στους 42 °C για 50 λεπτά, ώστε να γίνει σύνθεση του cDNA και η 2^η στους 72°C για 15 λεπτά ώστε να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση.

3.10 Real-Time PCR

Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR που το ενισχυμένο προϊόν DNA ανιχνεύεται στο τέλος της ανάλυσης, η PCR πραγματικού χρόνου (rt-PCR) ή αλλιώς ποσοτική PCR (qPCR) δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του DNA που συσσωρεύεται καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, σε πραγματικό χρόνο, καθώς το προϊόν ποσοτικοποιείται μετά από κάθε κύκλο. Το βασικό πλεονέκτημα της rt-PCR έναντι της συμβατικής PCR είναι ότι η πρώτη επιτρέπει την εύρεση του αρχικού αριθμού αντιγράφων DNA-στόχου στην αντίδραση. Έτσι, τα αποτελέσματα της μπορούν να είναι είτε ποιοτικά (ύπαρξη ή όχι του DNA-στόχου) ή ποσοτικά (αριθμός αντιγράφων). Στη Real-Time PCR χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, όπως η SYBR Green, η οποία δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και παράγει ποσοτική αύξηση του φθορισμού (520nm), ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγει φθορισμό. Στη συνέχεια ο φθορισμός που παράγεται μετριέται από τον ανιχνευτή φθορισμού του εξειδικευμένου θερμοκυκλοποιητή. Γενικά, η ποσότητα φθορισμού που υπολογίζεται είναι ανάλογη της ολικής ποσότητας DNA που παράγεται και μέσω της διαφοράς στην ποσότητα του φθορισμού στο πέρασμα του χρόνου υπολογίζεται και η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο. Πιο συγκεκριμένα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η Real-Time PCR, εκμεταλλεύεται την αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου, στον οποίο το

προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα (threshold circle, Ct) με τον αρχικό αριθμό αντιγράφων του DNA-στόχου.

Για τον υπολογισμό του αρχικού αριθμού αντιγράφων στο εξεταζόμενο δείγμα, χρησιμοποιείται μια σειρά αραιώσεων από δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης, από την οποία θα προκύψει και η αρχική ποσότητα DNA.

Για την επιβεβαίωση της εξειδίκευσης της μεθόδου αλλά και για την ανίχνευση διμερών εκκινητών και παραπροϊόντων, γίνεται ανάλυση της καμπύλης τήξης (Melting Curve), η οποία στηρίζεται στην απώλεια του φθορισμού, λόγω θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης. Αναλυτικότερα, επειδή το σημείο τήξης (T_m), δηλαδή η θερμοκρασία όπου το 50% του δίκλωνου DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, επηρεάζεται από το μέγεθος του συγκεκριμένου τμήματος νουκλεϊκού οξέος, από το περιεχόμενό του σε βάσεις GC, αλλά και από άλλους παράγοντες, διαφορετικά προϊόντα PCR (διμερή εκκινητών, παραπροϊόντα, αλληλουχία-στόχος) μπορούν να διακριθούν με βάση τις ιδιότητες τήξης τους. Έτσι, μειώνεται η ανάγκη για τη χρήση της χρονοβόρας gel ηλεκτροφόρησης για τη διάκριση των προϊόντων.

Για την real time PCR, χρησιμοποιήθηκε το FastGene[®] Taq ReadyMix (1X), το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα στοιχεία που απαιτούνται για την rt-PCR, εκτός από τους εκκινητές και το δείγμα DNA. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (10pmol) και 50nM ROX, που χρησιμεύει ως παθητική χρωστική για την κανονικοποίηση του φθορίζοντος σήματος, λόγω της ανίχνευσης ROX από το μηχάνημα. Τέλος προστέθηκε ddH₂O για τελικό όγκο 17μl. Στη συνέχεια 3μl από κάθε δείγμα και 17μl από το μίγμα που προετοιμάστηκε, προστέθηκαν σε Eppendorf 0.2ml. Παράλληλα, δις αποσταγμένο νερό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας στη θέση του δείγματος DNA για να επιβεβαιωθεί πως δεν υπάρχει επιμόλυνση των δειγμάτων.

Η rt-PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή ECO TM 48 PCRmax στις εξής συνθήκες:

1^{ος} κύκλος | -2 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA

40 κύκλοι	-5 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 ^{ος} κύκλος	- Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι universal και στοχεύουν στη συντηρημένη 5' αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών και φαίνονται παρακάτω:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Προσανατολισμός
ENV2	CCC CTG AAT GCG GCT AAT C	sense
ENV1	GAT TGT CAC CAT AAG CAG C	antisense

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των τεσσάρων στελεχών των Εντεροϊών.

3.10.1 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC₅₀)

Ως ανασταλτική συγκέντρωση 50% ή αλλιώς IC₅₀ ορίζεται η συγκέντρωση ενός αναστολέα κατά την οποία προκαλείται μείωση μιας συγκεκριμένης απόκρισης κατά 50%, *in vitro*. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η τιμή IC₅₀ αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ενός δείγματος μελιού που προκαλεί μείωση του ιικού τίτλου κατά 50%. Έτσι λοιπόν, η τιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της αντικής δράσης των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν. Για τον υπολογισμό της τιμής αυτής, χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα της real time PCR, κατά την οποία υπολογίστηκαν τα ικά αντίγραφα του κάθε δείγματος. Η μέτρηση της μεταβολής των ικών αντιγράφων του κάθε δείγματος σε σύγκριση με το V.C, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Comparative Ct και υπολογίστηκε από την παρακάτω εξίσωση:

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{(Ct \text{ virus control} - Ct \text{ of interest})}$$

Τελικά το ποσοστό αναστολής προκύπτει από την εξίσωση:

$$P.A \% (\text{Ποσοστό Αναστολής}) = (1 - 2^{-\Delta Ct}) \times 100\%$$

Απο τις τιμές που προκύπτουν σχεδιάζεται γραφική παράσταση συγκέντρωσης – ποσοστού αναστολής και από την εξίσωση της ευθείας υπολογίζεται η συγκέντρωση όπου υπάρχει ποσοστό αναστολής του ιού 50% ή αλλιώς η τιμή IC₅₀.

3.11 Υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας (SI)

Ο δείκτης επιλεκτικότητας SI ορίζεται ως ο λόγος της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC₅₀) προς την ανασταλτική συγκέντρωση 50% (IC₅₀) και μετρά την ικανότητα μιας ουσίας να αναστέλλει την ιική μόλυνση, χωρίς να προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας SI, τόσο πιο αποτελεσματική και ασφαλής είναι η συγκεκριμένη ουσία για τη χρήση της για θεραπεία ιικής μόλυνσης. Μέσω του δείκτη επιλεκτικότητας, λαμβάνονται υπόψη οι τιμές CC₅₀ και IC₅₀ των δειγμάτων μελιού, με στόχο να βρεθεί το μέλι με τη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα ως προς την καταπολέμηση του ιού. Έτσι, ένας υψηλός δείκτης SI δείχνει πως η αντική δράση του μελιού οφείλεται στην αναστολή του ιού και όχι στον θάνατο των κυττάρων λόγω τοξικότητας του μελιού.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα μέτρησης κυτταροτοξικότητας δειγμάτων μελιού στα κύτταρα Rd.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, η μέτρησης της κυτταροτοξικότητας των διάφορων τύπων μελιού έγινε μέσω της χρωματομετρικής δοκιμασίας MTT. Η μέθοδος αυτή υπολογίζει τον αριθμό των κυττάρων που είναι ζωντανά σε κάθε βοθρίο της πλάκας μικροτιτλοποίησης, μέσω μέτρησης της απορρόφησης στα (570 nm). Στο συγκεκριμένο μήκος κύματος απορροφούν οι διαλυμένοι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίζονται λόγω της μετατροπής του MTT από τη δράση των αφυδρογονασών των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και έχουν σκούρο μωβ χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα της φορμαζάνης και κατ' επέκταση γραμμικά ανάλογη με τη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων και εντέλει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Έτσι, δώδεκα διαφορετικά ελληνικά μέλια, και το μέλι Manuka πέρασαν από τη δοκιμασία βιωσιμότητας MTT, για να μετρηθεί η τοξικότητά τους απέναντι στα κύτταρα Rd. Για κάθε συγκέντρωση των διαφόρων τύπων μελιού χρησιμοποιήθηκαν 5 βοθρία, για τα οποία μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα (570 nm). Στη συνέχεια, από τις τιμές αυτές, κατασκευάστηκε μια γραφική παράσταση Βιωσιμότητας – Συγκέντρωσης μελιού, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η τιμή CC_{50} του κάθε μελιού. Δηλαδή, η συγκέντρωση κάθε δείγματος μελιού που προκαλεί καταστροφή στο 50% των κυττάρων, η οποία αποτελεί και μέτρο της τοξικότητας του μελιού στα κύτταρα Rd.

Τα αποτελέσματα των τιμών CC_{50} των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Μέλι	CC_{50} in Rd	SD
Πεύκο Χαλκιδικής (100)	2,16 mg/mL	0,46
Πεύκο Θάσος (99)	7 mg/mL	0,11
Πεύκο Ρόδος (64)	4,83 mg/mL	0,02
Πεύκο Ηράκλειο (129)	5,22 mg/mL	0,11

Έλατο Κορινθίας (15)	4,25 mg/mL	0,09
Βαμβάκι Λάρισα (41)	8,04 mg/mL	0,03
Θυμαρί Χανιά (44)	9,32 mg/mL	0,09
Θυμαρί Χίος (33)	10,64 mg/mL	0,36
Θυμαρί Κεφαλονιά (118)	12,09 mg/mL	0,26
Θυμαρί Κάλυμνος (68)	15,94 mg/mL	0,51
Ερείκη Άνδρος (39)	4,25 mg/mL	0,05
Καστανιά Αγ. Όρους (85)	31,7 mg/mL	0,1
Manuka	11,24 mg/mL	0,8

Πίνακας 2: Τιμές CC_{50} (mg/ml) των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν.

Από τις τιμές CC_{50} των δώδεκα ελληνικών δειγμάτων, προκύπτει το συμπέρασμα πως τη μικρότερη τοξικότητα προς τα κύτταρα Rd την εμφανίζει το μέλι καστανιάς Αγίου Όρους ($CC_{50} = 31.7$ mg/ml), ενώ αμέσως επόμενο είναι το μέλι θυμαριού Καλύμνου ($CC_{50} = 15,94$ mg/ml). Αντίθετα, τη μεγαλύτερη τοξικότητα την εμφανίζει το μέλι πεύκου Χαλκιδικής ($CC_{50} = 2,16$ mg/ml), ακολοθούμενο από το μέλι ερείκης Άνδρου και το μέλι ελάτης Κορινθίας ($CC_{50} = 4,25$ mg/ml). Το μέλι Manuka εμφάνισε τιμή $CC_{50} = 11,24$ mg/mL. Συνολικά, τρία ελληνικά μέλια, τα μέλια θυμαριού Κεφαλονιάς και Καλύμνου και το μέλι καστανιάς Αγίου Όρους εμφάνισαν χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα από το μέλι Manuka.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, υπάρχει μια παρόμοια διακύμανση στις τιμές CC_{50} μεταξύ των δειγμάτων μελιού κοινής βοτανικής προέλευσης. Στην εργασία εξετάστηκαν 4 δείγματα πευκόμελου από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Το κάθε δείγμα είχε τη δική του τιμή CC_{50} , ωστόσο, με εξαίρεση το πεύκο Χαλκιδικής, οι υπόλοιπες τιμές ήταν σχετικά κοντά μεταξύ τους (4.83 - 7). Το ίδιο ισχύει και για το μέλι θυμαριού, όπου όλα τα δείγματα εμφάνισαν υψηλές τιμές CC_{50} , οι οποίες ήταν αρκετά κοντά μεταξύ τους (9.32 – 15.94). Επομένως, γίνεται αντιληπτή η σημασία της βοτανικής προέλευσης του μελιού για τις ιδιότητες του και στη συγκεκριμένη περίπτωση για την κυτταροτοξική του δράση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως

βλ. υποκεφάλαιο 1.2.10, πέρα από την βοτανική προέλευση, επίδραση στις ιδιότητες του μελιού έχει και η γεωγραφική του προέλευση, πράγμα το οποίο φαίνεται και στο διάγραμμα όπου μέλια με κοινή βοτανική προέλευση, έχουν διαφορετική τιμή CC_{50} , λόγω της γεωγραφικής περιοχής από την οποία προέρχονται.

4.2 Αντική δράση δειγμάτων μελιού

4.2.1 Αποτελέσματα αντικής δράσης δειγμάτων μελιού

Όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 3.7, τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, στα οποία είχε προστεθεί ιός περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (16, 8, 4, 2, 1 mg/ml) του εκάστοτε δείγματος μελιού που μελετούνταν κάθε φορά. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control (V.C), κύτταρα Rd που μολύνθηκαν με τον εκάστοτε εντεροϊό. Η συγκέντρωση του ιού που χρησιμοποιήθηκε προκαλεί ολική καταστροφή των κυττάρων Rd, 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης. Η παρατήρηση της πλάκας μικροτιτλοποίησης για κυτταροπαθογόνο δράση (CPE) γινόταν καθημερινώς, έως ώτου να παρατηρούνταν ολική καταστροφή των κυττάρων στο V.C.

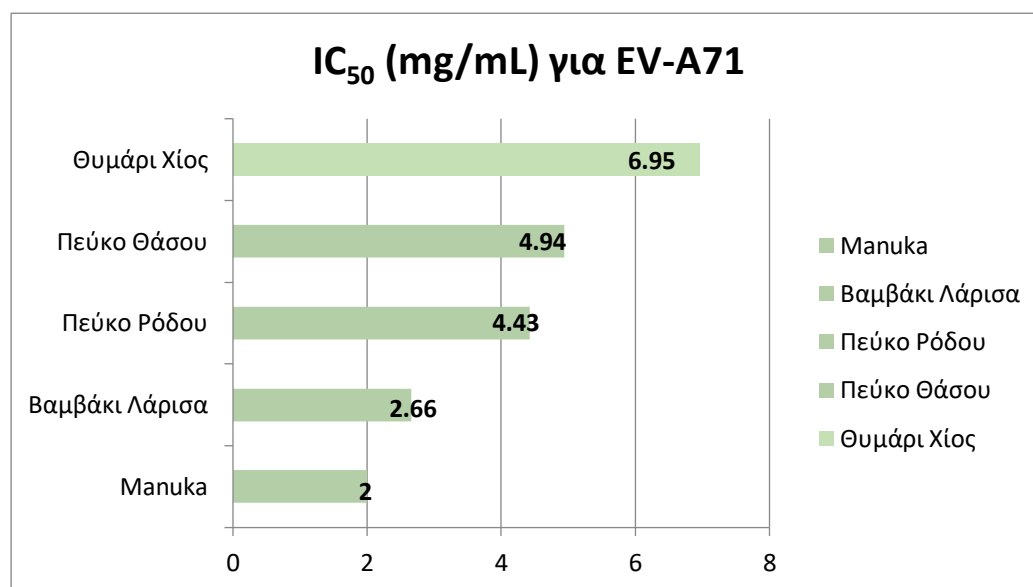
Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος, έδειξαν πως η διαφορά κυτταροπαθογόνου δράσης μεταξύ των συγκεντρώσεων 16, 8, 4, 2, 1 mg/ml και του V.C ήταν εμφανής και γιαυτόν το λόγο, αυτές οι συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ιικού τίτλου στα αντίστοιχα πηγαδάκια, μέσω real time PCR.

4.3 Αποτελέσματα μέτρησης ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC_{50})

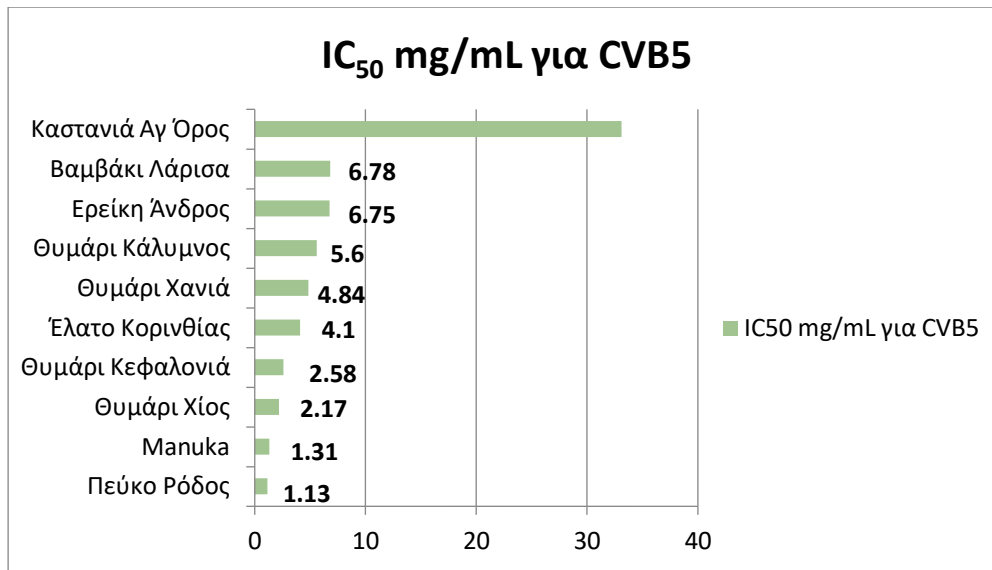
Για τη μέτρηση των τιμών IC_{50} έγινε αρχικά απομόνωση του ιικού RNA από τα πηγαδάκια συγκεντρώσεων μελιού 16, 8, 4, 2, 1 mg/ml και στη συνέχεια έπειτα από μετατροπή του RNA σε cDNA, μέσω της RT-PCR, πραγματοποιήθηκε real time PCR. Για την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που στοχεύουν στην 5' αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών.

Ο θετικός μάρτυρας (V.C) περιλαμβάνει μολυσμένα με ιό κύτταρα Rd και αποτελεί τη βάση για το ποσοστό μείωσης των ικών αντιγράφων. Επομένως, τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου των δειγμάτων μελιού εκφράστηκαν ως μεταβολή του αριθμού των ικών αντιγράφων ως προς τον θετικό μάρτυρα. Όσο μεγαλύτερο είναι η μείωση των αντιγράφων τόσο πιο αποτελεσματικά το μέλι αναστέλλει τον ιό. Στο θετικό μάρτυρα η μείωση είναι μηδενική.

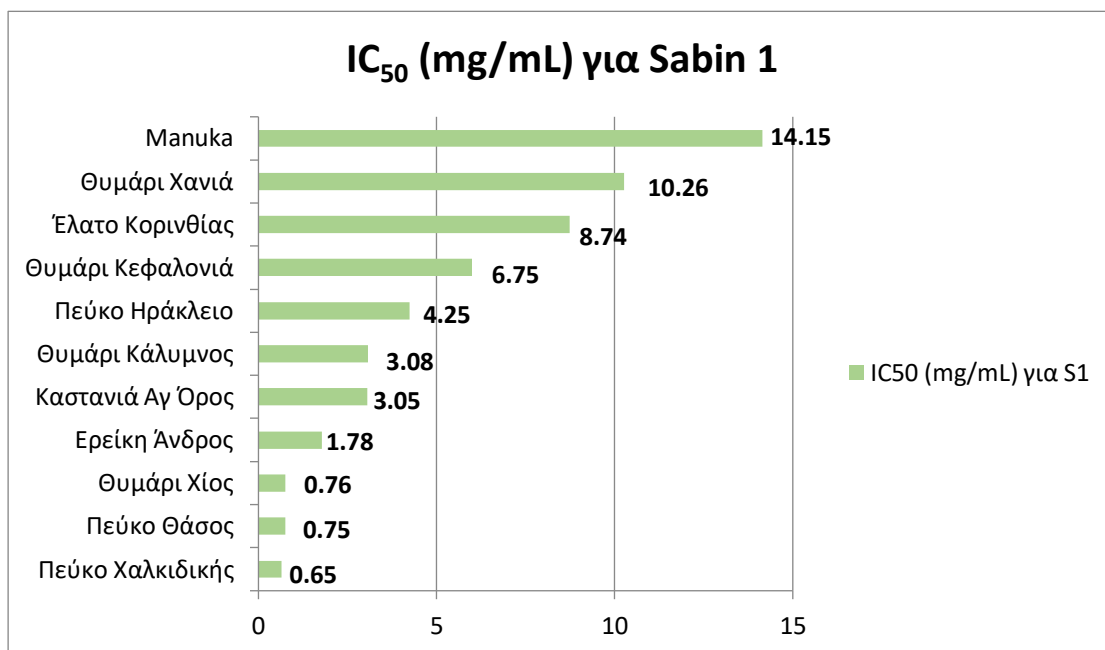
Απο τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε η γραφική παράσταση Ποσοστού αναστολής – Συγκέντρωσης μελιού και από την εξίσωση της ευθείας υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} για κάθε δείγμα μελιού. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται τα αποτελέσματα των τιμών IC_{50} για τα τέσσερα στελέχη εντεροϊού σε φθίνουσα σειρά. Μόνο ορισμένα δείγματα μελιού έδειξαν αντική δράση, συνεπώς στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται μόνο οι τιμές των μελιών που παρουσίασαν μείωση των ικών αντιγράφων κατά το πείραμα της real time PCR.



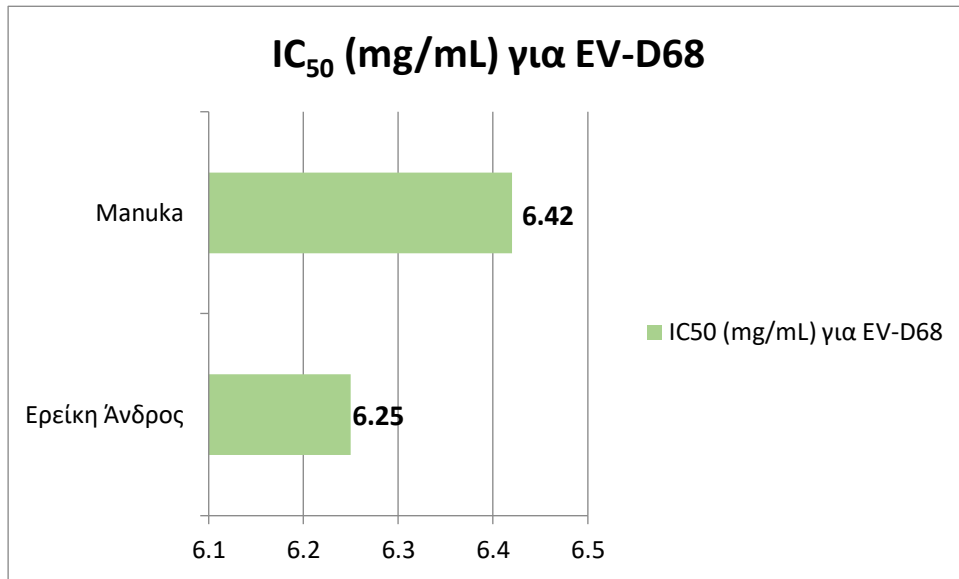
Διάγραμμα 1: Τιμές IC_{50} (mg/ml) των δειγμάτων μελιού για τον Εντεροϊό EV-A71.



Διάγραμμα 2: Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των δειγμάτων μελιού για τον Εντεροϊό CVB5



Διάγραμμα 3: Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των δειγμάτων μελιού για τον Εντεροϊό Sabin 1.



Διάγραμμα 4: Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των δειγμάτων μελιού για τον Εντεροϊό EV-D68 .

Για τον εντεροϊό A71, το μέλι με τη μικρότερη τιμή IC₅₀ είναι το μέλι Manuka, το οποίο προκαλεί μείωση των ικών αντιγράφων κατά 50% σε συγκέντρωση 2mg/ml. Από τα ελληνικά μέλια, αυτό με τη μικρότερη τιμή IC₅₀ είναι το μέλι βαμβακιού Λάρισα (2.66 mg/ml) και επομένως είναι το πιο αποτελεσματικό για την αναστολή του ιού. Το ελληνικό μέλι με τη μεγαλύτερη τιμή IC₅₀ ήταν το μέλι θυμαριού Χίου, με τιμή IC₅₀ = 6.95 mg/ml.

Για τον εντεροϊό CVB5, εννέα μέλια από τα δώδεκα έδειξαν ανασταλτική δράση έναντι του συγκεκριμένου ιού. Ειδικότερα, το μέλι πεύκου Ρόδου εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ = 1.13 mg/ml, ξεπερνώντας και το μέλι Manuka με τιμή IC₅₀ = 1.31 mg/ml. Από τα εννέα μέλια, το μέλι με την υψηλότερη τιμή IC₅₀ και συνεπώς τη χαμηλότερη αντική δράση, ήταν το μέλι καστανιάς Αγίου Όρους, με τιμή 33.1 mg/ml.

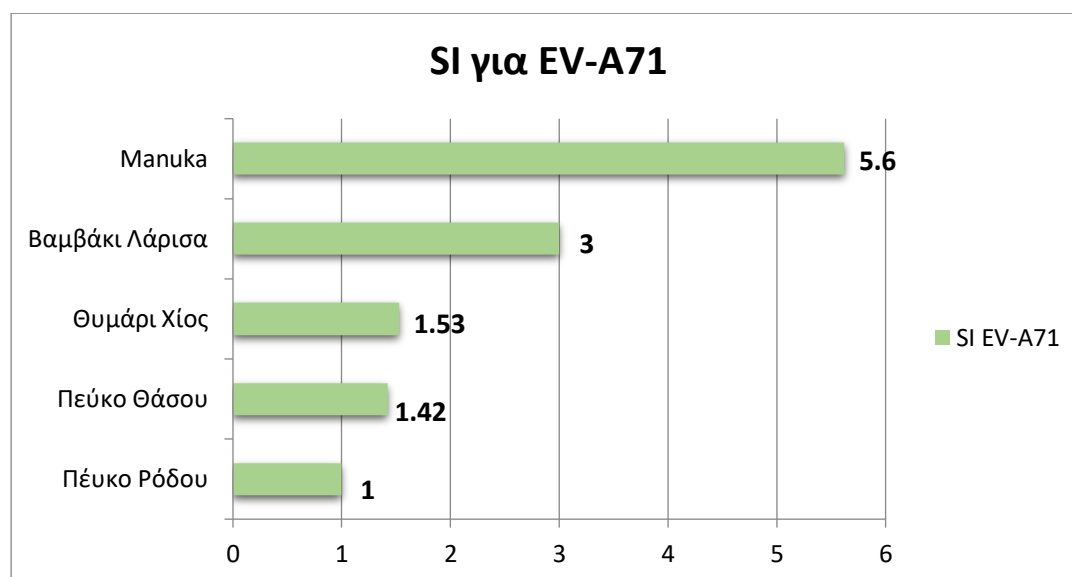
Για τον εντεροϊό Sabin 1, τα αποτελέσματα της real time PCR έδειξαν πως δέκα από τα δώδεκα μέλια που εξετάστηκαν παρουσίασαν αντική δράση έναντι του συγκεκριμένου στελέχους. Μάλιστα, το μέλι Manuka ήταν αυτό με την υψηλότερη τιμή IC₅₀ = 14.15 mg/ml, ενώ το μέλι πεύκου Χαλκιδικής, με τιμή IC₅₀ = 0.65 mg/ml εμφάνισε την υψηλότερη ανασταλτική δράση.

Τέλος, για τον εντεροϊό EV-D68, μόνο το μέλι Manuka και το μέλι Ερείκης Άνδρου εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι του συγκεκριμένου στελέχους, με το μέλι ερείκης Άνδρου να έχει τιμή IC_{50} 6.25 mg/ml, ενώ το Manuka 6.42 mg/ml.

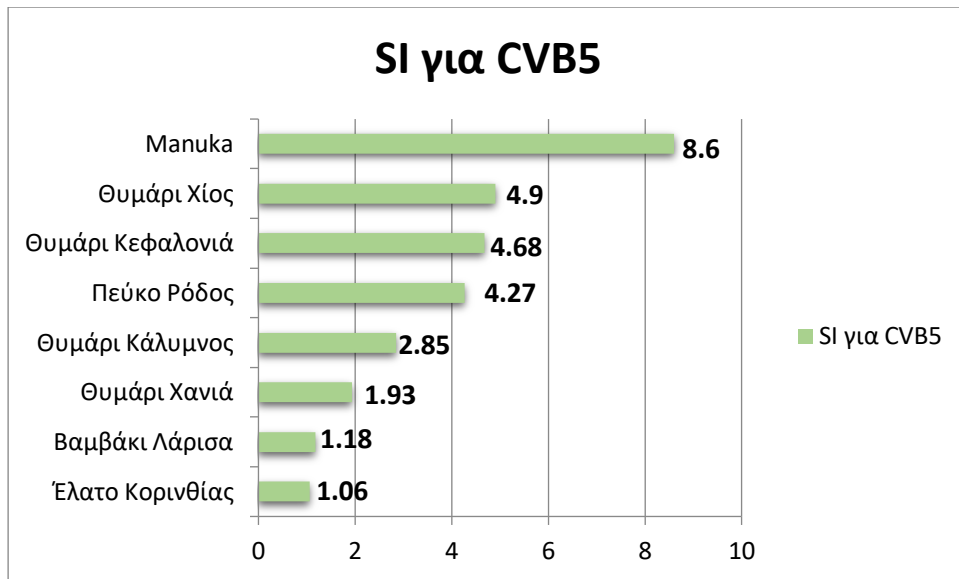
4.4 Αποτελέσματα δείκτη επιλεκτικότητας SI

Ο δείκτης επιλεκτικότητας (SI) υπολογίστηκε από το λόγο CC_{50} προς IC_{50} του κάθε μελιού. Όταν η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας είναι μεγαλύτερη του 1, τότε το δείγμα μελιού είναι ικανό να μειώσει τα ιικά αντίγραφα κατά 50% σε συγκέντρωση μικρότερη της συγκέντρωσης που απαιτείται για να προκαλέσει τοξικότητα στο 50% των κυττάρων.

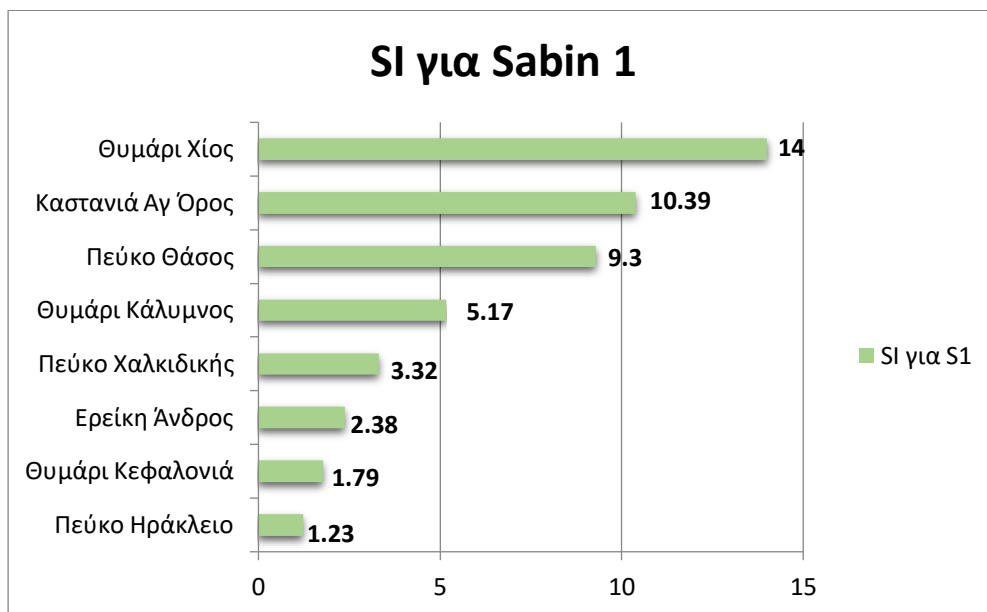
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας SI που είναι μεγαλύτερες της μονάδας έναντι των τεσσάρων στελεχών εντεροϊού, σε φθίνουσα σειρά. Τα μέλια με τιμές SI μικρότερες της μονάδας εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων Rd παρά ανασταλτική επίδραση έναντι του ιού και συνεπώς δεν παρουσιάζονται στα διαγράμματα.



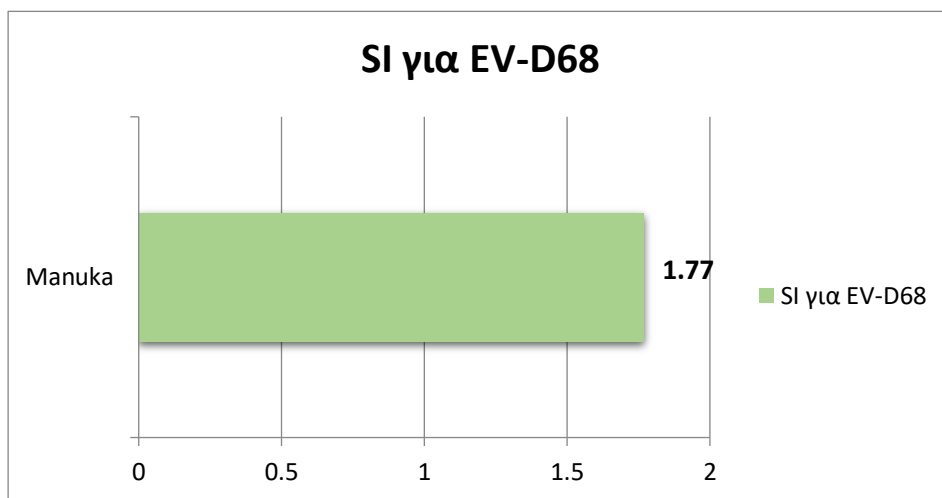
Διάγραμμα 5: Τιμή SI των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν για τον Εντεροϊό EV-A71.



Διάγραμμα 6: Τιμή SI των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν για τον Εντεροϊό CVB5.



Διάγραμμα 7: Τιμή SI των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν για τον Sabin 1.



Διάγραμμα 8: Τιμή SI των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν για τον Εντεροϊό EV-D68.

Για τον Εντεροϊό EV-A71 πέντα από τα δώδεκα μέλια που εξετάστηκαν έχουν δείκτη SI μεγαλύτερη ή ίση του 1. Από αυτά, το μέλι με το μεγαλύτερο δείκτη επιλεκτικότητας ήταν το μέλι Manuka το οποίο είχε τιμή $SI = 5.6$. Συνεπώς αυτό το μέλι είναι το πιο αποτελεσματικό για την καταπολέμηση του ιού δίχως να προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Από τα ελληνικά δείγματα μελιού, το μέλι με τη μεγαλύτερη τιμή ήταν το μέλι βαμβακιού Λάρισας ($SI = 3$), ενώ το μέλι με τη μικρότερη τιμή ήταν το μέλι πεύκου Ρόδου με τιμή $SI = 1$.

Αντίστοιχα, για το εντεροϊό CVB5, οκτώ από τα δώδεκα μέλια είχαν τιμή $SI > 1$. Πάλι το μέλι Manuka εμφάνισε τον υψηλότερο δείκτη επιλεκτικότητας, $SI = 8.6$, ενώ το ελληνικό μέλι που ήταν πιο αποτελεσματικό στην αναστολή του συγκεκριμένου στελέχους ήταν το μέλι θυμαριού Κρήτης με $SI = 4.9$. Αντιθέτως, από τα οκτώ αυτά μέλια, το μέλι ελάτης Κορινθίας εμφάνισε τη χαμηλότερη τιμή $SI = 1.06$.

Για τον Sabin 1, οκτώ μέλια είχαν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας και μάλιστα το μέλι Manuka δεν είναι μέσα σε αυτά. Το ελληνικό μέλι που κατάφερε να αναστείλει τον Sabin 1 πιο αποτελεσματικά ήταν το μέλι θυμαριού Χίου, με τιμή $SI = 14$, ενώ το μέλι με τη χαμηλότερη τιμή ήταν το μέλι πεύκου Ηρακλείου με τιμή $SI = 1.23$.

Τέλος για τον εντεροϊό EV-D68, μόνο το μέλι Manuka κατάφερε να καταπολεμήσει το συγκεκριμένο στέλεχος αποτελεσματικά, με τιμή $SI = 1.77$. Τα υπόλοιπα μέλια δεν έδειξαν αντική δράση έναντι του εντεροϊού EV-D68.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μέλι αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύτιμο φυσικό προϊόν του οποίου η χρήση τόσο για διατροφικούς σκοπούς όσο και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες πηγάζει από τα αρχαία χρόνια. Η παραδοσιακή ιατρική τονίζει συχνά τη σημασία του μελιού ως εναλλακτικό φάρμακο για τον άνθρωπο και την αξιοποίηση του για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών και μολύνσεων (Samarghandian, Saeed et al., 2017).

Οι θεραπευτική ικανότητα του μελιού οφείλεται στη σύσταση του. Ποικίλλες ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η μεθυλγλυκοζάλη, η bee defensin-1 έχουν βρεθεί πως προσδίδουν στο μέλι αυτές τις μοναδικές του ιδιότητες. Έτσι, το μέλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιδαβητικό και αντιμικροβιακό.

Αν και η αντιβακτηριακή δράση του μελιού έχει μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, η μελέτη της αντικής του δράσης βρίσκεται ακόμη στα αρχικά της στάδια. Προηγούμενες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως το μέλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την καταπολέμηση ικών μολύνσεων από τον ιό της γρίπης καθώς και από τους ιούς *Rubella*, *herpes simplex* και *varicella zoster* (Al-Walili, 2004; Zeina et al., 1996; Shahzad et al., 2012).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, δώδεκα ελληνικά δείγματα μελιού από διαφορετική γεωγραφική και βοτανική προέλευση εξετάστηκαν για την ικανότητα τους να αναστέλλουν ιογενείς αλλοιώσεις που προκαλούνται από τους εντεροϊούς EV-D68, EV-A71, CVB5, Sabin 1 και η ικανότητα τους αυτή συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αντική δράση του μελιού Manuka. Για τη μελέτη της αντικής ικανότητας των μελιών αλλά και για την κυτταροτοξικότητα που μπορούν να προκαλέσουν, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Rd.

Για τον υπολογισμό της κυτταροτοξικότητας του κάθε δείγματος μελιού, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 124 mg/ml, 68 mg/ml, 32 mg/ml, 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml και 1 mg/ml, οι οποίες εξετάστηκαν μέσω της δοκιμασίας MTT. Από τη δοκιμασία αυτή, προέκυψε η τιμή CC_{50} για κάθε δείγμα μελιού, η οποία

αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του μελιού που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν πως τα δείγματα μελιού με κοινή βοτανική προέλευση είχαν τιμές CC_{50} αρκετά κοντά μεταξύ τους. Ωστόσο υπήρχαν κάποιες εξαιρέσεις, οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των μελιών. Από τα δώδεκα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν, το μέλι με τη μικρότερη τοξικότητα προς τα κύτταρα Rd ήταν το μέλι καστανιάς Αγίου όρους ($CC_{50} = 31.7$ mg/ml) και ακολουθεί το μέλι θυμαριού Καλύμνου με $CC_{50} = 15.94$ mg/ml. Μάλιστα, συνολικά τρία μέλια εμφάνισαν ακόμη μικρότερη κυτταροτοξικότητα από το μέλι Manuka ($CC_{50} = 11.24$ mg/ml). Στην αντίθετη πλευρά, το μέλι πεύκου Χαλκιδικής εμφάνισε τη μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα ($CC_{50} = 2.16$ mg/ml), και το αμέσως επόμενο ήταν τα μέλια ελάτης Κορινθίας και ερείκης Άνδρου ($CC_{50} = 4.25$ mg/ml).

Στις προηγούμενες ενότητες, αναφέρθηκαν διάφορα συστατικά στα οποία το μέλι βασίζει τις ιδιότητες του. Ένα από τα συστατικά του μελιού που ευθύνονται για την κυτταροτοξική του δράση είναι οι φαινολικές ενώσεις, με τους Imtara et al. να αποδεικνύουν πως η αντικαρκινική δράση του μελιού βασίζεται στο περιεχόμενο του σε φαινολικά. Επιπλέον, οι Bacanlı et al. μελέτησαν φαινολικά όπως η γαλανγίνη, η κουρκουμίνη, η πυκνογενόλη, η πουεραρίνη και το ουρσολικό οξύ ως προς την κυτταροτοξικότητα τους σε κύτταρα V79, HeLa και BT-474. Αν και το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων διέφερε μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών, και τα πέντε φαινολικά που εξετάστηκαν κατάφεραν να μειώσουν τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων σε όλες τις κυτταρικές σειρές με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Επομένως, είναι αρκετά πιθανό πως και τα φαινολικά του μελιού δρουν με παρόμοιο τρόπο και πως η διαφορά στις τιμές CC_{50} μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία να οφείλεται στο διαφορετικό τους περιεχόμενο σε φαινολικά.

Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την κυτταροτοξικότητα του μελιού είναι η κυτταρική σειρά στην οποία προστίθεται το μέλι. Η συγκεκριμένη μελέτη κυτταροτοξικότητας μελιού πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα Rd, που αποτελούν μη-καρκινική κυτταρική σειρά. Όπως έδειξαν και οι Yaacob et al., το μέλι από το δέντρο Tualang μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7, αλλά όχι στην μη-καρκινική κυτταρική σειρά MCF-10A. Αυτό εξηγεί και τη διαφορά μεταξύ της τιμής CC_{50} για το μέλι Manuka που βρέθηκε σε αυτήν την εργασία και στη μελέτη των Watanabe et al., όπου η τιμή CC_{50} για το μέλι Manuka

(UMF 15+) σε κύτταρα MDCK βρέθηκε 82.3 mg/ml. Αντιθέτως, η τιμή CC50 για τα κύτταρα Rd βρέθηκε να είναι αρκετά μικρότερη 11,24 mg/ml. Η διαφορά αυτή πιθανώς οφείλεται στο ότι η κυτταρική σειρά Rd είναι καρκινική και συνεπώς το μελι είναι πιο τοξικό σε αυτή απ'ότι στην κυτταρική σειρά MDCK που δεν είναι καρκινική.

Ωστόσο, η κυτταροτοξικότητα του μελιού μπορεί επίσης να διαφέρει και μεταξύ διαφορετικών μη-καρκινικών κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Bacanlı et al., η κυτταροτοξικότητα των διαφορετικών φαινολικών που εξετάστηκαν διέφερε σε κάποιο ποσοστό μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν. Συνεπώς, το μέλι μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, αναλόγως με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται.

Για τη μελέτη της αντικής δράσης των δειγμάτων μελιού, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού επώαστηκαν με ισόποσο όγκο του κάθε στελέχους του ιού και στη συνέχεια οι αραιώσεις ενοφθαλμίστηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων που περιείχε κύτταρα Rd. Στα δείγματα των συγκεντρώσεων 16, 8, 4, 2 και 1 mg/ml πραγματοποιήθηκε real time PCR για να υπολογιστεί ο ιικός τίτλος και κατ'επέκταση το ποσοστό μείωσης των ιικών αντιγράφων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (V.C).

Απο τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου, υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ενός δείγματος μελιού στην οποία προκαλεί μείωση του ιικού τίτλου κατά 50%. Για την αναστολή του Εντεροϊού A71, τη μικρότερη τιμή IC₅₀ την παρουσίασε το μέλι Manuka, ενώ για τον Εντεροϊό CVB5, το μέλι πεύκου Ρόδου ήταν αυτό με τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀. Τέλος, το μέλι πεύκου Ηρακλείου καταπολέμησε τον Sabin 1 πιο αποτελεσματικά από τα άλλα μέλια και το μέλι ερείκης Άνδρου κατάφερε να αναστείλει τον εντεροϊό EV-D68 σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα μέλια που εξετάστηκαν.

Η αντική δράση ενός δείγματος μελιού μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον ιό που χρειάζεται να καταπολεμησει αλλά πιθανώς και ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται. Το μέλι μπορεί να δράσει ενάντια στους ιούς είτε άμεσα στοχεύοντας τον ίδιο τον ιό είτε έμμεσα μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην άμυνα των κυττάρων (Zareie et al., 2011). Στη συγκεκριμένη εργασία το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε, εμφάνισε τιμές IC₅₀ = 2, 1.31, 8.6 και 6.42 για τα

στελέχη A71, CVB5, Sabin 1 και EV-D68 αντίστοιχα, ενώ σε αντίστοιχη μελέτη των Watanabe et al., το μέλι Manuka με UMF 15+ κατάφερε σε συγκέντρωση 3.6 mg/ml να μειώσει τα ιικά αντίγραφα του ιού της γρίπης κατά 50% σε κύτταρα MDCK. Επιπλέον, σε έρευνα των Shahzad et al., βρέθηκε πως το μέλι Manuka μπορεί να μειώσει τον ιικό τίτλο του ιού έρπητα ζωστήρα σε κύτταρα MeWo σε συγκέντρωση $EC_{50} = 4.5\%$ wt/vol. Ακόμη οι Obossou et al. έδειξαν πως το μέλι Manuka κατάφερε να αναστείλει τη λειτουργία της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού HIV κατά 50% σε συγκέντρωση $IC_{50} = 14.8$ mg/ml (Obossou et al., 2021). Φαίνεται, επομένως, πως το ίδιο μέλι μπορεί να αναστείλει σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό διαφορετικούς ιούς. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη εντεροϊών, που ακόμα και αν ανήκουν στην ίδια οικογένεια, εμφανίζουν διαφορές ως προς την αναστολή τους από το μέλι. Σε έρευνα των Smeets et al. αποδείχτηκε πως η ίδια αντική ένωση, η ribodaniv κατάφερε να αναστείλει αποτελεσματικά τον Εντεροϊό EV-A71 και όχι τον Εντεροϊό EV-D68 σε κύτταρα Rd, ενώ σχεδόν όλες οι υπόλοιπες ενώσεις που εξετάστηκαν ανέστειλλαν επιτυχώς τον EV-D68 και όχι τον EV-A71. Επιπροσθέτως, οι Tan et al., έδειξαν πως η χημική ένωση SG82 είχε αντική ικανότητα έναντι του Εντεροϊού A71 με τιμή $EC_{50} = 0.15 \pm 0.03$ μ M, ενώ η αντίστοιχη τιμή EC_{50} για τον πολιοϊό PV1 (Sabin) , ήταν 41 ± 18 μ M.

Συμπερασματικά, διαφορετικά μέλια έχουν διαφορετικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή και σε άλλες αντικές ενώσεις, ενώ διαφορετικοί ιοί ή διαφορετικά στελέχη του ίδιου γένους ιών μπορούν να εμφανίσουν μικρότερη ή μεγαλύτερη ευαισθησία στις ίδιες αντικές ενώσεις.

Το τελικό στάδιο για την εκτίμηση της αντικής ικανότητας των δειγμάτων μελιού, ήταν ο υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας SI. Η τιμή του SI προκύπτει από το λόγο της τιμής CC_{50} προς τη τιμή IC_{50} του μελιού. Όταν η τιμή CC_{50} είναι μεγαλύτερη από τη τιμή IC_{50} , σημαίνει πως το συγκεκριμένο μέλι μπορεί να αναστείλει την ιική μόλυνση σε συγκέντρωση μικρότερη από εκείνη που απαιτείται για να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα. Από τα μέλια που εξετάστηκαν τα μέλια Manuka, βαμβακιού Λάρισας, θυμαριού Χίου, πεύκου Θάσου και πεύκου Ρόδου είχαν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας και επομένως είναι ασφαλή για να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση μόλυνσης από Εντεροϊό A71. Αντίστοιχα, τα μέλια Manuka, θυμαριού Χίου, θυμαριού Κεφαλονιάς, θυμαριού Καλύμνου, πεύκου Ρόδου, θυμαριού Χανίων, βαμβακιού Λάρισας και ελάτης Κορνθίας ανέστειλλαν αποτελεσματικά τον ιό CVB5.

Ακόμη, τα μέλια θυμαριού Χίου, καστανιάς Αγίου Όρους, πεύκου Θάσου, θυμαριού Καλύμνου, πεύκου Χαλκιδικής, ερείκης Άνδρου, θυμαριού Κεφαλονιάς και πεύκου Ηρακλείου εμφάνισαν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας για τον Sabin 1. Τέλος, μόνο το μέλι Manuka εμφάνισε τιμή SI > 1 για τον Εντεροϊό EV-D68.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση της αντιικής ικανότητας 12 δειγμάτων ελληνικών τύπων μελιού διαφορετικής γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης, έναντι των εντεροϊών EV-D68, EV-A71, CVB5 και Sabin 1 σε κύτταρα Rd. Πολλά από τα ελληνικά μέλια κατάφεραν να αναστείλουν αποτελεσματικά ένα ή περισσότερα από τα τέσσερα στελέχη εντεροϊού που εξετάστηκαν. Είναι, επομένως, απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για την αντιική δράση των μελιών αυτών έναντι περισσότερων τύπων ιών, ώστε να αποδειχτεί η θεραπευτική τους ικανότητα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Adriane Alexandre Machado De-Melo, Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, María Teresa Sancho & Ana Pascual-Maté (2018) Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review, *Journal of Apicultural Research*, 57:1, 5-37.
- ❖ Ahmed, Sarfraz, et al. “Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, 2018, pp. 1–19.
- ❖ Al-Farsi, Mohamed et al. “Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey.” *Heliyon* vol. 4,10 e00874. 21 Oct. 2018.
- ❖ Al-Habsi, Nasser A et al. “Development of novel methods to determine crystalline glucose content of honey based on DSC, HPLC, and Viscosity measurements, and their use to examine the setting propensity of honey.” *Journal of food science* vol. 78,6 (2013): E845-52.
- ❖ Al-Waili N. S. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(2):135–140.
- ❖ Al-Waili, Noori S. “Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions.” *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* vol. 10,8 (2004): MT94-8

- ❖ Aljohar, Haya I et al. “Physical and chemical screening of honey samples available in the Saudi market: An important aspect in the authentication process and quality assessment.” *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* vol. 26,7 (2018): 932-942.

- ❖ Alqarni, Abdulaziz S., et al. “Mineral Content and Physical Properties of Local and Imported Honeys in Saudi Arabia.” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, no. 5, 2014, pp. 618–625.

- ❖ Alvarez-Suarez, José M., et al. “Phenolics from Monofloral Honeys Protect Human Erythrocyte Membranes against Oxidative Damage.” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 5, 2012, pp. 1508–1516.

- ❖ Alvarez-Suarez, José M et al. “The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey.” *Foods (Basel, Switzerland)* vol. 3,3 420-432. 21 Jul. 2014.

- ❖ Aparna & D. Rajalakshmi (1999) Honey—its characteristics, sensory aspects, and applications, *Food Reviews International*, 15:4, 455-471.

- ❖ Bacanli, Merve et al. “Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods.” *Turkish journal of pharmaceutical sciences* vol. 14,2 (2017): 95-107

- ❖ Baggen, Jim et al. “The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it.” *Nature reviews. Microbiology* vol. 16,6 (2018): 368-381.

- ❖ Batumalaie, Kalaivani et al. “Effect of gelam honey on the oxidative stress-induced signaling pathways in pancreatic hamster cells.” *International journal of endocrinology* vol. 2013 (2013): 367312.

- ❖ Castro-Vázquez, L., et al. “Aroma Composition and New Chemical Markers of Spanish Citrus Honeys.” *Food Chemistry*, vol. 103, no. 2, 2007, pp. 601–606.

- ❖ Castro-Vázquez, Lucia et al. “Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker.” *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 54,13 (2006): 4809-13.

- ❖ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “Enterovirus D68”. <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html>

- ❖ Cianciosi, Danila et al. “Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review.” *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 23,9 2322. 11 Sep. 2018.

- ❖ da Silva, Priscila Missio et al. “Honey: Chemical composition, stability and authenticity.” *Food chemistry* vol. 196 (2016): 309-23.

- ❖ Ediriweera, E R H S S, and N Y S Premarathna. “Medicinal and cosmetic uses of Bee's Honey - A review.” *Ayu* vol. 33,2 (2012): 178-82.

- ❖ Eleftheriou, E., Tsiripidis, I., Karabournioti, S. (2009). Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys. *Journal of Apicultural Research*, 48(2), 104-114.

- ❖ Eraslan, Gökhan et al. “Beneficial effect of pine honey on trichlorfon induced some biochemical alterations in mice.” *Ecotoxicology and environmental safety* vol. 73,5 (2010): 1084-91.

- ❖ Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-Gonzalez, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84-90.

- ❖ Esposito, Susanna et al. “Enterovirus D68 Infection.” *Viruses* vol. 7,11 6043-50. 24 Nov. 2015.

- ❖ Eteraf-Oskouei, Tahereh, and Moslem Najafi. “Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review.” *Iranian journal of basic medical sciences* vol. 16,6 (2013): 731-742.

- ❖ Guillot, S et al. “Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans.” *Journal of virology* vol. 74,18 (2000): 8434-43.

- ❖ Hara, Yaeko et al. “Partial Protection of Paclitaxel-induced Neurotoxicity by Antioxidants.” *In vivo (Athens, Greece)* vol. 32,4 (2018): 745-752.

- ❖ Hermosín Isidro, et al. “Free Amino Acid Composition and Botanical Origin of Honey.” *Food Chemistry*, vol. 83, no. 2, 2003, pp. 263–268.

- ❖ Iglesias, M. Teresa, et al. “Changes in the Free Amino Acid Contents of Honeys During Storage at Ambient Temperature.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 24, 2006, pp. 9099–9104.

- ❖ Imtara, Hamada, et al. “Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in

Morocco and Palestine.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2019, 2019, pp. 1–11.

- ❖ Israili, Zafar H. “Antimicrobial Properties of Honey.” *American Journal of Therapeutics*, vol. 21, no. 4, 2014, pp. 304–323.

- ❖ Johnston, Matthew et al. “Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview.” *AIMS microbiology* vol. 4,4 655-664. 27 Nov. 2018.

- ❖ Karabagias, Ioannis K et al. “Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses.” *Food chemistry* vol. 165 (2014): 181-190.

- ❖ Karabagias, Ioannis K et al. “Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics.” *Food chemistry* vol. 217 (2017): 445-455.

- ❖ Kaskoniene, V., Venskutonis, P. R., & Ceksteryte, V. (2008). Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. *Food Chemistry*. 111, 988–997.

- ❖ Kato, Yoji et al. “Plausible authentication of manuka honey and related products by measuring leptosperin with methyl syringate.” *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 62,27 (2014): 6400-7.

- ❖ Kuś, Piotr M et al. “Screening of Polish Fir Honeydew Honey Using GC/MS, HPLC-DAD, and Physical-Chemical Parameters: Benzene Derivatives and Terpenes as Chemical Markers.” *Chemistry & biodiversity* vol. 14,9 (2017).

- ❖ León-Ruiz, Virginia, et al. “Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC.” *Food Analytical Methods*, vol. 6, no. 2, 2012, pp. 488–496.

- ❖ Lin, Derong, et al. “An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes.” *Molecules*, vol. 21, no. 10, 2016, p. 1374.

- ❖ Lin, JY., Kung, YA. & Shih, SR. Antivirals and vaccines for Enterovirus A71. *J Biomed Sci* 26, 65 (2019).

- ❖ Liu, Yue et al. “Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68.” *Nature communications* vol. 6 8865. 13 Nov. 2015.

- ❖ Majtan, Juraj et al. “Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing.” *Archives of dermatological research* vol. 305,7 (2013).

- ❖ Mandal, Manisha Deb, and Shyamapada Mandal. “Honey: Its Medicinal Property and Antibacterial Activity.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 1, no. 2, 2011, pp. 154–160.

- ❖ Mato, Inés, et al. “Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 5, 2006, pp. 1541–1550.

- ❖ McDonald, Claire M., et al. “Using Chemical and DNA Marker Analysis to Authenticate a High-Value Food, Manuka Honey.” *Npj Science of Food*, vol. 2, no. 1, 2018.

- ❖ Miguel, M G et al. “Honey as a Complementary Medicine.” *Integrative medicine insights* vol. 12 1178633717702869. 24 Apr. 2017.

- ❖ Nolan, Victoria C et al. “Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey.” *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 8,4 251. 5 Dec. 2019.

- ❖ Obossou EK, Shikamoto Y, Hoshino Y, Kohno H, Ishibasi Y, Kozasa T, Taguchi M, Sakakibara I, Tonooka K, Shinozuka T, Mori K. Effect of manuka honey on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase activity. *Nat Prod Res*. 2021 Feb 8:1-6.

- ❖ Olaitan, Peter B et al. “Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes.” *African health sciences* vol. 7,3 (2007): 159-165.

- ❖ Park, Jong-Seok et al. “Chestnut Honey Impregnated Carboxymethyl Cellulose Hydrogel for Diabetic Ulcer Healing.” *Polymers* vol. 9,7 248. 27 Jun. 2017.

- ❖ Patel, Seema, and Simon Cichello. “Manuka honey: an emerging natural food with medicinal use.” *Natural Products and Bioprospecting* vol. 3,4 121–128. 5 Jul. 2013.

- ❖ Pohl, Pawel, et al. “Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from Commercial Bee Honeys.” *Food Chemistry*, vol. 134, no. 1, 2012, pp. 392–396.

- ❖ Puenpa, J., Wanlapakorn, N., Vongpunsawad, S. *et al.* The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. *J Biomed Sci* 26, 75.

- ❖ Rezapkin GV, Chumakov KM, Lu Z, Ran Y, Dragunsky EM, Levenbook IS. Microevolution of Sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. *Virology*. 1994 Jul;202(1):370-8.

- ❖ Roberts A, Brown HL, Jenkins R. On the antibacterial effects of manuka honey: mechanistic insights. *Research and Reports in Biology*. 2015; 6:215-224.

- ❖ Ruisinger, Brigitte, and Peter Schieberle. “Characterization of the key aroma compounds in rape honey by means of the molecular sensory science concept.” *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 60,17 (2012): 4186-94.

- ❖ Samarghandian, Saeed et al. “Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research.” *Pharmacognosy research* vol. 9,2 (2017): 121-127.

- ❖ Saxena, Sudhanshu et al. “Rheology of Indian Honey: Effect of Temperature and Gamma Radiation.” *International journal of food science* vol. 2014 (2014): 935129.

- ❖ Shahzad, Aamir, and Randall J Cohrs. “In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles.” *Translational biomedicine* vol. 3,2 (2012).

- ❖ Singh, Iqbal, and Sukhmeet Singh. “Honey moisture reduction and its quality.” *Journal of food science and technology* vol. 55,10 (2018): 3861-3871.

- ❖ Smee, Donald F et al. “Susceptibilities of enterovirus D68, enterovirus 71, and rhinovirus 87 strains to various antiviral compounds.” *Antiviral research* vol. 131 (2016): 61-5.

- ❖ Snowdon, Jill A, and Dean O Cliver. “Microorganisms in Honey.” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 31, no. 1-3, 1996, pp. 1–26.

- ❖ Sun, Jing et al. “Current Understanding of Human Enterovirus D68.” *Viruses* vol. 11,6 490. 29 May. 2019.

- ❖ Tan, Jinzhi et al. “3C protease of enterovirus 68: structure-based design of Michael acceptor inhibitors and their broad-spectrum antiviral effects against picornaviruses.” *Journal of virology* vol. 87,8 (2013): 4339-51.

- ❖ Tariq N, Kyriakopoulos C. Group B Coxsackie Virus. [Updated 2020 Dec 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.

- ❖ Tokarz, Rafal et al. “Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68.” *The Journal of general virology* vol. 93,Pt 9 (2012): 1952-1958

- ❖ Tomczyk, Monika, et al. “The Influence of Geographical Origin on Honey Composition Studied by Polish and Slovak Honeys.” *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 37, no. No. 4, 2019, pp. 232–238.

- ❖ Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., & Sagdic, O., et al. (2013) Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. 46, 124 – 131.

- ❖ Torre, Donato, et al. “Role of Nitric Oxide in HIV-1 Infection: Friend or Foe?” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 2, no. 5, 2002, pp. 273–280.

- ❖ van Meerloo, Johan et al. “Cell sensitivity assays: the MTT assay.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 731 (2011): 237-45.

- ❖ Watanabe, Ken, et al. “Anti-Influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey.” *Archives of Medical Research*, vol. 45, no. 5, 2014, pp. 359–365.

- ❖ White J.W. & Doner Landis W. “Honey Composition and Properties.” *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook*, no. 335, pp. 82-91.

- ❖ Won, S. A., Li, C., Kim, J., & Rhee, H. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, 113, 1334–1338.

- ❖ Yaacob, N.S., Ismail, N.F. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity of 4-hydroxytamoxifen in combination with *Tualang* honey in MCF-7 and MCF-10A cells. *BMC Complement Altern Med* 14, 106 (2014).

- ❖ Zareie, Parvaneh et al. “Honey as an antiviral agent against respiratory syncytial virus.” MS Thesis. University of Waikato (2011).

- ❖ Zeina, Bassam, et al. “Effect of Honey versus Thyme on Rubella Virus Survival in Vitro.” *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 2, no. 3, 1996, pp. 345–348.

- ❖ Zenilman, Jonathan M et al. “Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults.” *Antiviral research* vol. 123 (2015): 114-9.

- ❖ Αλλυσανδράκης, Ελευθέριος. Μελισσοκομία. Ηράκλειο, 2007.
<https://eclass.hmu.gr/modules/document/file.php/GF110/Melissokomia.pdf>

- ❖ Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη, Σ., Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. *1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας*, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002.
- ❖ Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (2001). *Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 2001, για το μέλι.*

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- **Εικόνα 1.1.1.1:** *NCBI Insights Blog* (2018): *Apis mellifera* honey bee
- **Εικόνα 1.4.8.1:** Farraji, Hossein, et al. “Phytoremediation: Green Technology for Improving Aquatic and Terrestrial Environments.” *Nippon Journal of Environmental Science*, vol. 1, no. 1, 2020, doi:10.46266/njes.1002.
- **Εικόνα 1.5.4.1:** Ahmed, Sarfraz, et al. “Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, 2018, pp. 1–19.
- **Εικόνα 1.6.1.1:** Sun, Jing et al. “Current Understanding of Human Enterovirus D68.” *Viruses* vol. 11,6 490. 29 May. 2019.

- **Εικόνα 1.6.1.2:** 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 Jun;16(6):368-381.
- **Εικόνα εξωφύλλου:** Science Picture Co/Getty Images