



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**«Ανίχνευση της αντιϊκής δράσης του μελισσόψωμου έναντι του ιού της
γρίπης Α»**

ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Λάρισα 2022

Ανίχνευση της αντιϊκής δράσης του μελισσόψωμου έναντι του ιού της γρίπης Α

Study of the antiviral activity of beebread against influenza A virus

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 διπλωματική πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την επίβλεψη και καθοδήγησή του κατά την διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόκαρδα τον Δημητρίου Τηλέμαχο, καθώς χωρίζτην πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγηση του η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Επιπλέον, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. ΑσούτηΔιδάρα Νικόλαο, για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε ώστε να μου δώσει σημαντικά στοιχεία πάνω στο θέμα.

Τέλος, θα επιθυμούσα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία, την απεριόριστη συμπαράσταση και την φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο.....	9
Εικόνα 1.....	9
1.2 Ιδιότητες μελισσόψωμου.....	10
1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	10
1.2.2 Αντικαρκινική δράση.....	11
1.2.3 Αντιμικροβιακή δράση.....	11
1.2.4 Αντι-ιική δράση.....	11
1.3 Ιός της γρίπης Α.....	12
Εικόνα 2.....	13
1.4 Κύκλος ζωής του ιού.....	14
Εικόνα 3:.....	15
1.5 Αντιική θεραπεία για τον ιό της γρίπης Α.....	15
Εικόνα 4.....	17
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	18
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
3.1 Δείγματα μελισσόψωμου και γύρης.....	19
Πίνακας 1:.....	19
3.2 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	19
3.3 Καλλιέργεια κυττάρων.....	20
3.4 Πειραματικό ιικό στέλεχος.....	21
3.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας.....	21
3.5.1 Δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με MTT.....	21
Εικόνα 5.....	22
Εικόνα 6.....	23
3.5.2 Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC ₅₀).....	23
3.6 Έλεγχος αντι-ιικής δράσης.....	24
3.7 Εκχύλιση ιϊκού RNA.....	26
3.8 Αντίστροφη μεταγραφή.....	26
3.9 Real – TimePCR.....	27

3. 10 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC_{50}).....	29
3.11 Υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας (SI).....	29
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
4.1 Προσδιορισμός κυτταρικής τοξικότητα και τιμές CC_{50}	31
Πίνακας 2:.....	31
4.2 Αντι-ιική δράση και IC_{50}	31
Εικόνα 7.....	32
Πίνακας 3.....	33
4.3 Selectivity Index.....	33
Εικόνα 8.....	34
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, οι ουσίες φυσικής προέλευσης αποτελούν ολοένα και πιο συχνό αντικείμενο μελέτης για τους ερευνητές, εξαιτίας των πολλαπλών ευεργετικών δράσεων που διαθέτουν. Το ενδιαφέρον αυτό βρίσκει αντίκρισμα και στα μελισσοκομικά προϊόντα, και πιο συγκεκριμένα σε ένα προϊόν κυψέλης, το μελισσόψωμο. Το προϊόν αυτό, φαίνεται να διαθέτει πολλές διατροφικές αρετές, διάφορα βιοενεργά μόρια με θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες. Ανάμεσα σ' αυτές, σημαντική θέση λαμβάνει η αντιμικροβιακή δράση του όσον αφορά την καταπολέμηση ανθεκτικών μικροβίων.

Στην παρούσα μελέτη, εξετάζεται η αντι-ιική δράση που ασκούν τρία δείγματα μελισσόψωμου ελληνικής προέλευσης, έναντι του ιού της γρίπης Α, ενώ ταυτόχρονα διερευνήθηκε και η τοξικότητα του συγκεκριμένου προϊόντος έναντι της κυτταρικής σειράς MDCK. Ο ιός της γρίπης Α θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς έχει την ικανότητα να προκαλέσει πανδημία γρίπης προκαλώντας ιδιαίτερα σημαντικά προβλήματα στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα.

Έγινε απομόνωση του ιικού RNA γονιδιώματος και αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής, ώστε να ενισχυθεί με χρήση Real-Time PCR. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} για κάθε δείγμα αλλά και τον προσδιορισμό της αντι-ιικής δράσης έναντι του ιού. Παράλληλα, η μέτρηση της τοξικότητας στο παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας βιωσιμότητας των κυττάρων με MTT. Τέλος, υπολογίστηκαν οι τιμές SI μέσω της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης προς την ανασταλτική συγκέντρωση, όπου φάνηκε ποιο δείγμα ανέστειλε την ιική μόλυνση χωρίς να προκαλεί κυτταροτοξικότητα, και παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Λέξεις κλειδιά: μελισσόψωμο, γύρη, αντι-ιική δράση, ιός γρίπης Α, Real-Time PCR

ABSTRACT

In the last few years, substances of natural origin have been an object of increasing and frequent study by researchers, due to their multiple beneficial actions. This interest is also appears to beekeeping products, and particularly in a hive product, beebread. This product seems to have many nutritional virtues, various bioactive molecules with therapeutic or preventive properties. Among these properties, the antimicrobial action that offers plays a major role in terms of destroying resistant pathogens.

This study, is examining the antiviral activity of three Greek sample of bee bread against influenza A, while at the same time is investigating the toxicity of bee bread samples against MDCK cells. Influenza A virus is considered especially important, as it has the ability to cause an influenza pandemic affecting significant problems in the upper respiratory system.

The viral RNA genome was isolated and reverse transcribed into cDNA by using reverse transcription protocols, so as to be amplified, through Real-Time PCR technique. Moreover, the results from PCR technique were analyzed so as to calculate the IC_{50} value for each sample and to determine the antiviral activity against the influenza A virus.

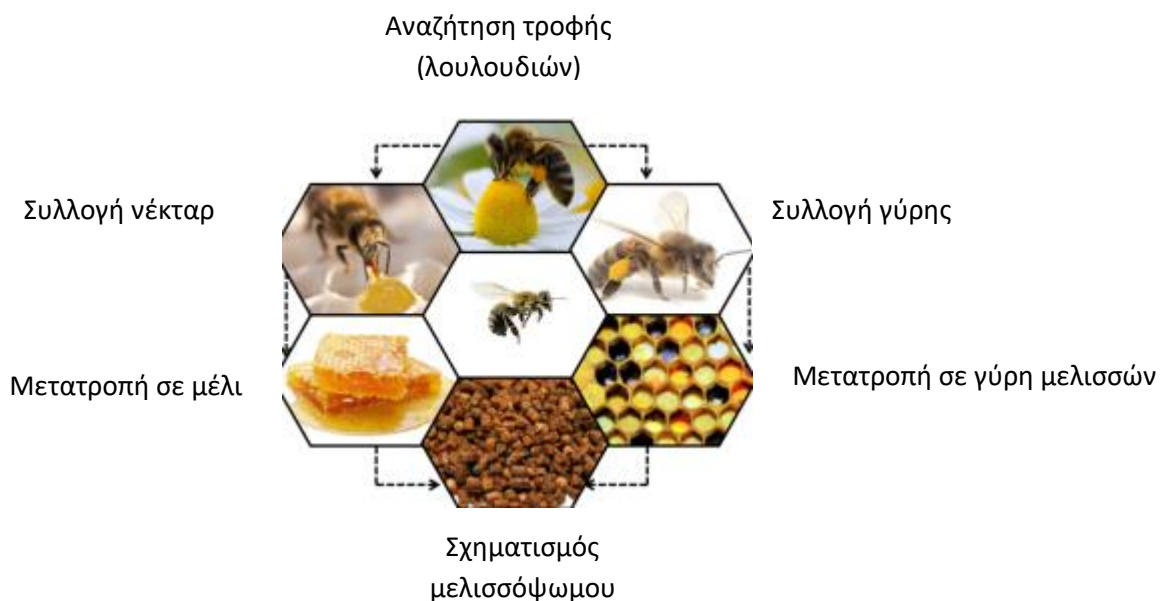
Additionally, toxicity measurement in the present experiment was performed by the MTT cell viability test. Then, the SI values were calculated using the cytotoxic concentration CC and the inhibitory concentration IC, in order to see which sample inhibited the viral infection without causing cytotoxicity. and the results were presented. Finally, the results are presenting.

Keywords; beebread, pollen, antiviral action, influenza A virus, Real-Time PCR

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο

Το μελισσόψωμο, αποτελεί ένα μείγμα που είναι αποτέλεσμα ζύμωσης της γύρης των φυτών, του μελιού και του σάλιου των εργατριών μελισσών (*Apis mellifera*). Πιο συγκεκριμένα, η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες (συλλέκτριες), αναμιγνύεται με μέλι και σάλιο και τοποθετείται στην κηρήθρα. Εκεί, υφίσταται μια χημική διαδικασία που σαν αποτέλεσμα έχει τη δημιουργία του μελισσόψωμου (Gilliam, 1979). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μια γαλακτική ζύμωση μεταξύ της γύρης που συλλέγεται από τις μέλισσες και των πεπτικών ενζύμων τους, και στη συνέχεια φυλάσσονται στην κυψέλη, μεταξύ ενός στρώματος μελιού και κεριού (Kieliszek *etal.*, 2018). Κατά τη διάρκεια της γαλακτικής ζύμωσης, το pH μειώνεται, και αρχίζει η ωρίμανση του μελισσόψωμου. Επέρχεται η πέψη των κόκκων γύρης από τα προστιθέμενα ένζυμα της μέλισσας καθώς και τα ένζυμα που παράγονται από το μικροβίωμα του μελισσόψωμου και έτσι αυξάνεται η θρεπτική του αξία (Didaras, N. A., *etal.*, 2021). Επιπλέον, το μελισσόψωμο αποτελεί κύρια πηγή τροφής εντός της κυψέλης, ειδικά για τις προνύμφες και τις νεαρές μέλισσες (Kieliszek *etal.*, 2018).



Εικόνα 1: Η διαδικασία σχηματισμού του μελισσόψωμου στην κυψέλη (Bakour M., *etal.*, 2022).

Μελέτες που αφορούν στη χημική σύσταση του μελισσόψωμου, έδειξαν ότι συνήθως αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα και άλλα βιοδραστικά μόρια, τα οποία έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, όπως πρεβιοτικά, προβιοτικά, φυτικές ίνες και μέταλλα (Märgäoan, R., *etal.*, 2019). Σύμφωνα με τους Nagai*etal.*(2004), η σύνθεση του φαίνεται να διαμορφώνεται με 20% πρωτεΐνη, 3% λιπίδια, 24–35% υδατάνθρακες και 3% μέταλλα και βιταμίνες. Η σύνθεση αυτή, ποικίλει ανάλογα τη βοτανική προέλευση, τις κλιματολογικές συνθήκες και την εποχή (Bakour, M., *etal.*, 2019). Επίσης, στο συγκεκριμένο προϊόν, περιέχονται σημαντικές βιταμίνες όπως τοκοφερόλη, νιασίνη, θειαμίνη, βιοτίνη, φολικόξύ αλλά και πολυφαινόλες, καροτενοειδή, φλαβονοειδή, φυτοστερόλες, ένζυμα και συνένζυμα (Bakour., M., *etal.*, 2017). Γενικότερα, η θρεπτική αξία του μελισσόψωμου είναι υψηλότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα προϊόντα κυψέλης, λόγω της παρουσίας υψηλής περιεκτικότητας σε ελεύθερα αμινοξέα και αφομοιώσιμα σάκχαρα (Bakour, M., *etal.*, 2019). Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η διαφορά μεταξύ μελισσόψωμου και γύρης, καθώς το πρώτο περιέχει περισσότερα σάκχαρα και πολύ λιγότερη ποσότητα σε άμυλο (Kieliszek*etal.*, 2018).

1.2 Ιδιότητες μελισσόψωμου

Τα φυσικά μελισσοκομικά προϊόντα, όπως το μέλι, το μελισσόψωμο, ο βασιλικός πολτός και η πρόπολη έχουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαθηρογόνες ιδιότητες και χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υγείας εδώ και πολλά χρόνια (Borawska, M. H., *etal.*, 2013). Επιπλέον, το μελισσόψωμο έχει αντικαρκινική και προστατευτική δράση (Bakour, M., *etal.*, 2022).

1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από το μελισσόψωμο, φάνηκε πως πολλά από τα μόρια που περιέχει, έχουν αντιοξειδωτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των μορίων έχει αξιολογηθεί με χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων (Bakour M., *etal.*,

2022). Σύμφωνα με τους Nagai *etal.*(2004), τα εκχυλίσματα του μελισσόψωμου φάνηκε να έχουν υψηλές αντιοξειδωτικές ικανότητες και ικανότητες έναντι ελεύθερων ριζών όπως το υπεροξειδίο και η ρίζα του υδροξυλίου. Η αντιοξειδωτική του δράση φαίνεται να οφείλεται κυρίως σε ουσίες όπως τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες (Bakour, M.,*etal.*, 2017).

1.2.2 Αντικαρκινική δράση

Η αντικαρκινική δράση του μελισσόψωμου έχει αξιολογηθεί σε διάφορες μελέτες *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, οι Markiewicz-Zukowska *etal.* (2013), χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα μελισσόψωμου, Πολωνικής προέλευσης, για να ελέγξουν τη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς U87MG μετά το πέρας 24, 48 και 72 ωρών. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα του μελισσόψωμου όπου χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη, μείωσαν τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων με ποσοστά που κυμαίνονται από 49% έως 66%. Αυτό το ανασταλτικό αποτέλεσμα εμφανίστηκε κυρίως μετά την παρέλευση 72 ωρών.

1.2.3 Αντιμικροβιακή δράση

Έρευνα των AboudaZ.*etal.*, (2011), μελέτησε την αντιμικροβιακή δράση του μελισσόψωμου από τρεις διαφορετικές περιοχές του Μαρόκου ενάντια των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli*. Από τα αποτελέσματα της έρευνας φάνηκε πως όλα τα δείγματα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση και μάλιστα έντονη, με μεγαλύτερη ευαισθησία στα Gram-θετικά βακτήρια. Η αντιμικροβιακή δράση του μελισσόψωμου οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό και στα οργανικά οξέα που περιέχονται σ' αυτό, όπως για παράδειγμα το γλυκονικό οξύ (Masoura, M.,*etal.*,2020).

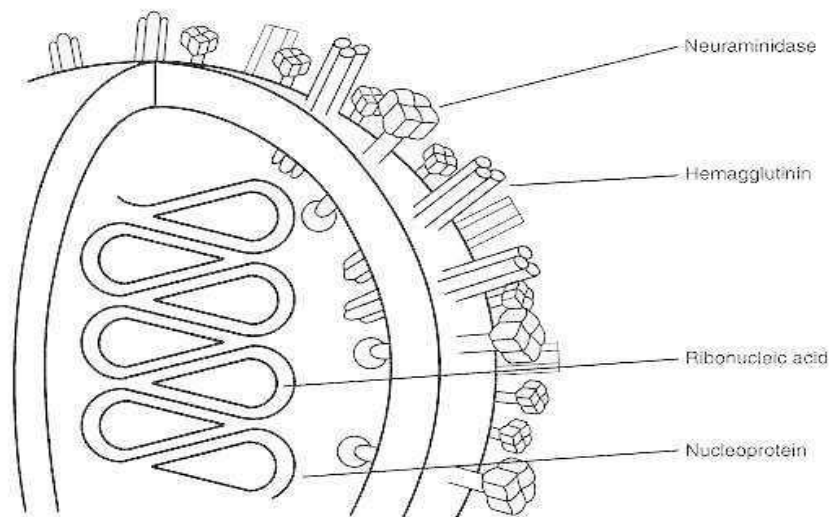
1.2.4 Αντι-ιική δράση

Όσον αφορά την αντι-ιική δράση του μελισσόψωμου, η μόνη έρευνα που αποκάλυψε αυτή του την ιδιότητα είναι των Didaras *etal.*μελετώντας τον ιό EV-D68. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν πολύ καλές τιμές μέσης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀) και κυτταροτοξικής συγκέντρωσης(CC₅₀) (Didaras *etal.*, 2021). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως η αντιική δράση των προϊόντων κυψέλης οφείλουν αυτή την ιδιότητα τους σε

συστατικά όπως οι πολυφαινόλες, το καφεϊκό οξύ, τα φλαβονοειδή όπως για παράδειγμα η χρυσίνη κ.α. (Lima, W. G., *etal.*, 2020).

1.3 Ιός της γρίπης A

Οι ιοί της γρίπης ανήκουν στην οικογένεια των Orthomyxoviridae και ταξινομούνται ως τύποι A, B, C, ή ως τύπος D που εντοπίστηκε σχετικά πρόσφατα. Οι ιοί της γρίπης A (IAVs) και B (IBVs) περιέχουν αρνητικής πολικότητας, μονόκλινα γονιδιακά τεμάχια ιικού RNA (vRNA) για πού κωδικοποιούν για 10 βασικές ιικές πρωτεΐνες και αρκετές βοηθητικές πρωτεΐνες (Dou, D., *etal.*, 2018). Είναι σφαιρικοί ή νηματοειδείς, διαμέτρου 80-120nm, και διαθέτουν περίβλημα. Το περίβλημα αυτό αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα λιπιδίων (Samji T., 2009) που φέρει γλυκοπρωτεΐνες, με κυριότερες να είναι η αιμοσυγκολλητίνη (HA), η νευραμινιδάση (NA) η matrix 1 (M1) (Gamblin, S. J., & Skehel, J. J., 2010) και η M2 πρωτεΐνη που επίσης βρίσκεται στην μεμβράνη του ιού (Parniak M.A. *etal.*, 2006). Οι δύο πρώτες έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζουν το ίδιο μόριο του κυττάρου ξενιστή, το σιαλικό οξύ, ενώ η M1 βρίσκεται κάτω από την ιική λιπιδική μεμβράνη όπου συγκρατεί τις ιικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (vRNPs). Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσυγκολλητίνη συνδέεται στα κύτταρα-στόχους, με υποδοχείς που περιέχουν σιαλικό οξύ, ώστε να ξεκινήσει η μόλυνση από τον ιό, ενώ η νευραμινιδάση διασπά τα μόρια σιαλικού οξέος από τους κυτταρικούς υποδοχείς και τους εξωκυτταρικούς αναστολείς, για να διευκολύνει την απελευθέρωση των ιοσωματίων και να προωθήσει την εξάπλωση της μόλυνσης σε γειτονικά κύτταρα (Wagner, R., *etal.*, 2002). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως απαιτείται αρκετά καλή αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των υποδοχέων (δέσμευσης-καταστροφής) για την αποτελεσματική αντιγραφή του ιού.



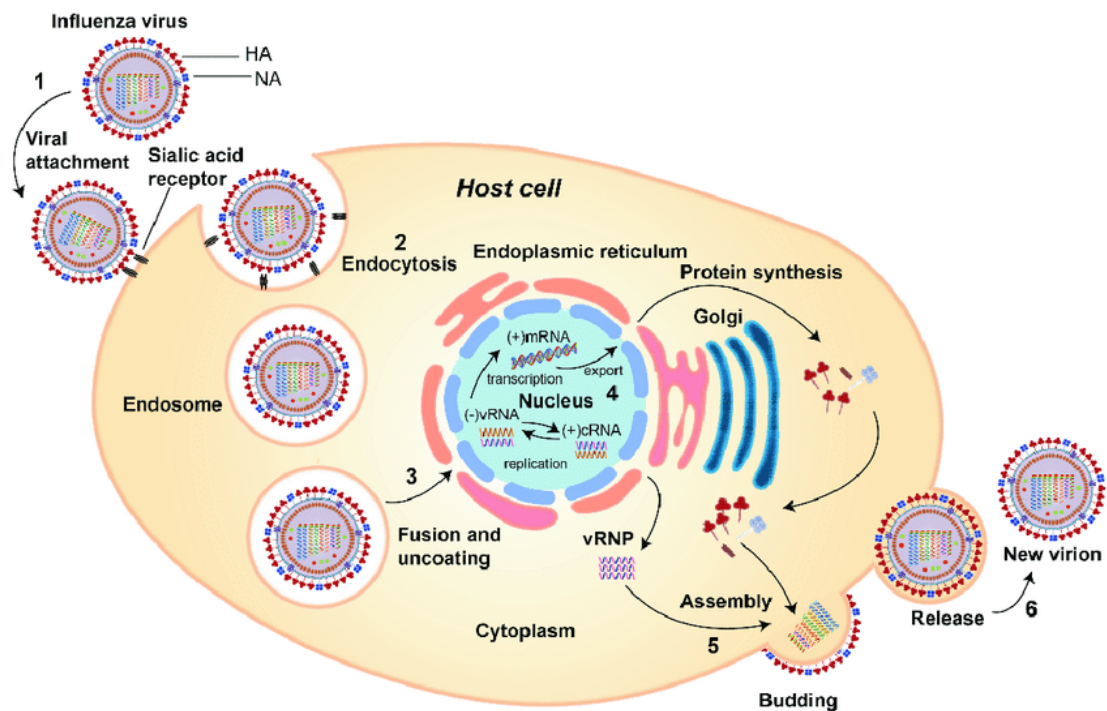
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση ενός τμήματος του σωματιδίου του ιού της γρίπης. Η αιμοσυγκολλητίνη και η νευραμινιδάση προεξέχουν από την επιφάνεια του ιού (CouchRB. Orthomyxoviruses,1996).

Οι συγκεκριμένοι ιοί προέρχονται κυρίως από υδρόβια πουλιά, και προσβάλλουν τόσο τους ανθρώπους όσο και άλλα ζώα. Οι περισσότεροι προκαλούν ασυμπτωματική ή ήπια μόλυνση σε πτηνά, όπου το εύρος των συμπτωμάτων εξαρτάται από τις ιδιότητες του ιού (WHO,2018).Όσον αφορά τον άνθρωπο, μπορούν να προκαλέσουν αρχικά ήπια λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού (πυρετός και βήχας) έως και σοβαρή πνευμονία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, ακόμη και θάνατο. Η μετάδοση του ιού γίνεται κυρίως μέσω άμεσης επαφής με μολυσμένα ζώα ή μολυσμένο περιβάλλον(WHO,2018). Σύμφωνα με το Υπουργείο Υγείας και το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, μπορεί να συμβεί μέσω του βήχα, του φτερνίσματος ή ακόμα και μέσω της ομιλίας και των σταγονιδίων. Επιπλέον, μπορεί να συμβεί μέσω της επαφής με μολυσμένα αντικείμενα και την άμεση τοποθέτηση των χεριών στο στόμα, στην μύτη και τα μάτια. Τέλος, παράγοντες όπως ο ψυχρός καιρός και ο συγχρωτισμός (συγκέντρωση πολλών ατόμων σε κλειστούς χώρους) αυξάνουν τη μετάδοση της γρίπης.

1.4 Κύκλος ζωής του ιού

Ο κύκλος ζωής του ιού της γρίπης διέρχεται από διάφορα στάδια και έχει ως εξής: αρχικά προσκολλάται ο ιός στον υποδοχέα του σιαλικού οξέος και πραγματοποιείται η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Έπειτα, αποκαλύπτονται τα σωματίδια του ιού, εισέρχονται οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες (vRNPs) στον πυρήνα του κυττάρου και το γονιδίωμα του ιικού RNA μεταγράφεται και αντιγράφεται. Στη συνέχεια, απομακρύνονται οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες από τον πυρήνα και τα ιικά συστατικά εκβλαστώνουν στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Τέλος απελευθερώνονται τα νέα ιοσωμάτια από τα κύτταρα του ξενιστή (Nuwarda, R. F. *etal.*, 2021).

Πιο αναλυτικά, το πρώτο στάδιο της ιογενούς μόλυνσης είναι η προσκόλληση της αιμοσυγκολλητίνης στα μόρια του σιαλικού οξέος που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Η είσοδος του ιού στο κύτταρο του ξενιστή πραγματοποιείται με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης, μέσω ενός υποδοχέα και έτσι ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο σε ένα ενδόσωμα. Εκεί, επειδή το pH είναι όξινο (pH 5-6) απελευθερώνονται οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες όπου κατευθύνονται προς τον πυρήνα, όπου καταφέρνουν και εισέρχονται. Οι ιικές πρωτεΐνες ανιχνεύουν σήματα για τον εντοπισμό του πυρήνα, και κατά συνέπεια εισέρχονται εκεί για να υποστούν τις διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής. Το RNA αρνητικής πολικότητας μετασχηματίζεται πρώτα σε RNA θετικής πολικότητας και χρησιμεύει ως πρότυπο για τη δημιουργία ιικού RNA, ακολουθούμενη από την εσωτερική σύνθεση RNA που ξεκινά από την RNA πολυμεράση. Έπειτα, οι πρωτεΐνες του ιού (HA, NA), μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη όπου τα ιοσωμάτια εκβλαστώνουν από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, μετά το πέρας του σχηματισμού των ιικών σωματιδίων, υπολείμματα σιαλικού οξέος διασπώνται με τη βοήθεια της νευραμινιδάσης, επιτρέποντας στα σωματίδια του ιού να απομακρυνθούν από τη μεμβράνη του ξενιστή και να εξαπλωθούν στα κύτταρα (Nuwarda, R. F. *etal.*, 2021).



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του ιού της γρίπης A (Nuwarda, R. F. *et al.*, 2021).

1.5 Αντιική θεραπεία για τον ιό της γρίπης A

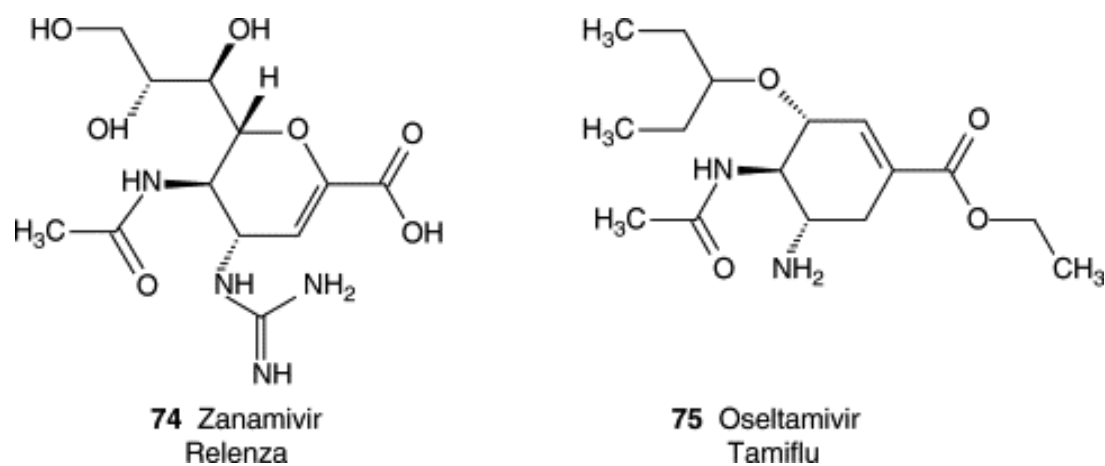
Ο ιός της γρίπης A, μπορεί να αντιμετωπιστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Με τον εμβολιασμό, με την χρήση ουσιών που αναστέλλουν την νευραμινιδάση αλλά και με την δράση στο κανάλι πρωτονίων M2 του ιού. Σύμφωνα με την εθνική υπηρεσία δημόσιας υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, ο εμβολιασμός έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της σοβαρότητας της νόσου, των νοσηλείων αλλά και του κινδύνου θανάτων. Τα εμβόλια κατά της γρίπης προκαλούν την ανάπτυξη αντισωμάτων στο σώμα περίπου δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Επί του παρόντος, υπάρχουν τρεις τύποι εμβολίων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως: το αδρανοποιημένο εμβόλιο (IIV), το εξασθενημένο εμβόλιο (LAIV) και το ανασυνδυασμένο εμβόλιο HA (Nuwarda, R. F., *et al.*, 2021). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), τα εμβόλια για την γρίπη υπάγονται σε 3 διαφορετικές τεχνολογίες παραγωγής. Η πρώτη βασίζεται στην παραγωγή τους με βάση το

αυγό. Πιο συγκεκριμένα αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιείται για την παραγωγή του αδρανοποιημένου και του εξασθενημένου εμβολίου, για πάνω από 70 χρόνια. Η δεύτερη τεχνολογία βασίζεται στα κύτταρα, και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για την παρασκευή αδρανοποιημένων εμβολίων και τέλος, υπάρχει η τεχνολογία ανασυνδυασμού που εγκρίθηκε το 2013 για χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (<https://www.cdc.gov/flu/prevent/how-fluvaccine-made.htm>).

Όσον αφορά τις ουσίες αμανταδίνη και ριμανταδίνη, λειτουργούν με πανομοιότυπο τρόπο, εμποδίζοντας την μετατόπιση πρωτονίων. Πιο συγκεκριμένα, στοχεύουν την πρωτεΐνη διαύλου ιόντων M2 του ιού (Intharather, P., *etal.*, 2008). Η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης είναι να επιτρέπει στον ενδοκυτταρικό ιό να αναδιπλασιαστεί και να εξωκυττώσει τις νεοσχηματισμένες ιικές πρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο (αποβολή ιού) ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ως διάυλος πρωτονίων για τα ιόντα υδρογόνου ώστε να περάσουν στο κυστίδιο. Έτσι, μπλοκάροντας το κανάλι M2, ο ιός δεν μπορεί να αναπαραχθεί λόγω εξασθενημένης αναπαραγωγής, πρωτεϊνοσύνθεσης και εξωκυττάρωσης. Συνεπώς οι ουσίες αμανταδίνη και ριμανταδίνη εισχωρούν στο κανάλι M2 εμποδίζοντας τη λειτουργία των πόρων - δηλαδή τη μετατόπιση πρωτονίων (Hussain M., *etal.*, 2017).

Μέχρι πρόσφατα, οι επιλογές διαχείρισης του ιού της γρίπης Α, περιορίζονταν στον εμβολιασμό ή στη χρήση των αντι-ιικών ουσιών αμανταδίνη και ριμανταδίνη (Dreitlein, W. B., Maratos, J., & Brocavich, J., 2001). Το 1999, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (Food and Drug Administration ή FDA ή USFDA) αποδέχτηκε τη χρήση δύο αντιικών ουσιών, της ζαναμιβίρης (zanamivir ή εμπορικά γνωστό Relenza ή 5-ακετυλαμινο-4-γκουναδινο-6-(1,2,3-τριυδροξυπροπυλ)-5,6-διυδρο-4H-πυραν-2-καρβοξυλικό οξύ) και της οσελταμιβίρης (oseltamivir ή γνωστό ως Tamiflu ή 4-ακετυλαμινο-5-αμινο-3-(1-αιθυλοπροποξυ)-κυκλοεξ-1-ενο καρβοξυλικό οξύ). Τα τελευταία χρόνια, οι ουσίες αυτές που λειτουργούν ως αναστολείς νευραμινιδάσης, zanamivir και oseltamivir, έχουν γίνει διαθέσιμες για τη θεραπεία ή την προφύλαξη από τους ιούς της γρίπης Α και Β. Οίος, όπως έχει

προαναφερθεί, έχει υιοθετήσει μια μοναδική στρατηγική αντιγραφής χρησιμοποιώντας μια από τις επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, την αιμοσυγκολλητίνη (HA), για να συνδεθεί με τον υποδοχέα των κυττάρων-στόχων (που περιέχει ένα τερματικό σιαλικό οξύ) και μια άλλη επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη, την νευραμινιδάση, για να αποκόψει το τελικό σιαλικό οξύ, επιτρέποντας έτσι στα σωματίδια του ιού να φύγουν από τα κύτταρα μετά την ολοκλήρωση του κύκλου αναπαραγωγής. Οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την απελευθέρωση των νέων ιοσωματίων από τα μολυσμένα κύτταρα, σταματώντας έτσι την εξάπλωση του ιού σε άλλα κύτταρα (De Clercq, E., 2007).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της δομής των ουσιών ζαναμιβίρη και οσελταμιβίρη, αντίστοιχα (De Clercq, E., 2007).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της αντι-ιικής δράσης του ελληνικού μελισσόψωμου έναντι του ιού της γρίπης Α, αλλά και του πιθανού μηχανισμού μέσω του οποίου ασκείται η αντι-ιική δράση.

Για το λόγο αυτό διάφορες συγκεντρώσεις τριών δειγμάτων ελληνικού μελλισσόψωμου και γύρης χρησιμοποιήθηκαν σε ένα σύστημα κυτταροκαλλιιεργειών που μολύνονταν με τον ιό της γρίπης Α. Η πιθανή αντι-ιική δράση ανιχνεύτηκε με τη χρήση μιας συγκριτικής RT-Real-Time PCR μεθόδου, μέσω της οποίας συγκρίνονταν ο ιικός τίτλος των δειγμάτων παρουσία και απουσία του μελισσόψωμου.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα μελισσόψωμου και γύρης

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τρία. Δύο από αυτά είναι δείγματα μελισσόψωμου και ένα δείγμα γύρης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται περισσότερες λεπτομέρειες για το κάθε δείγμα.

Όνομασία δείγματος	Περιοχή Προέλευσης	Βοτανική Προέλευση
1	Λάρισα	Πολυανθικό
4	Λάρισα	Πολυανθικό
6 γύρη	Θεσσαλία	Πολυανθικό

Πίνακας 1: Γεωγραφική θέση και βοτανική προέλευση δειγμάτων μελισσόψωμου και γύρης

3.2 Προετοιμασία των δειγμάτων

Όπως προαναφέρθηκε, συνολικά εξετάστηκαν 3 δείγματα ως προς την αντι-οική τους δράση. Αρχικά, ζυγίστηκαν 100mg από το εκάστοτε δείγμα με χρήση ζυγαριάς ακριβείας, και τοποθετήθηκαν σε tubes των 2 ml, με τελικό όγκο το 1ml (sterile ddH₂O). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε vortex για την άριστη διαλυτοποίηση των δειγμάτων.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το πρωτεϊνικό κομμάτι των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 100mg από τα τρία δείγματα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε tubes των 2 ml με χρήση ddH₂O σε τελικό όγκο το 1 ml. Πραγματοποιείται φυγοκέντριση για 30 λεπτά, στις 10.000xg. Γίνεται λήψη του υπερκείμενου, φιλτράρισμα σε φίλτρο 0.22μm και στη συνέχεια προστίθεται 0,67g θειικό αμμώνιο έτσι ώστε να επιτευχθεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (salting out) (MERCK, Art 1217). Επιτυγχάνεται διάλυση με ελαφριά ανάδευση και στη συνέχεια τοποθέτηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους -20°C. Έπειτα, πραγματοποιείται μια δεύτερη φυγοκέντριση στις 11.000 στροφές για 30 λεπτά και το ίζημα που υπάρχει στο erpendorf αποτελεί το πρωτεϊνικό κλάσμα των δειγμάτων, και επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml ddH₂O.

Οι αραιώσεις των διάφορων δειγμάτων έγιναν με τη διαλυτοποίηση τους σε συγκεκριμένη ποσότητα του θρεπτικού υλικού D-MEM (Biosera). Πραγματοποιήθηκαν 8 διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό να αποκτηθούν οι παρακάτω τελικές συγκεντρώσεις : 32,16, 8, 4, 2, 1, 0.5 και 0,25mg/ml.

3.3 Καλλιέργεια κυττάρων

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων μελισσόψωμου και της αντι-ιικής τους δράσης ήταν η κυτταρική σειρά MDCK (Madin-Darby canine kidney) από νεφρούς σκύλων.

Τα κύτταρα MDCK αναπτύχθηκαν μαζί με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Biosera, France), 1X Antibiotic-Antimycotic (Biosera, France) και 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biosera, France) σε πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιεργειών, οι οποίες στη συνέχεια επωάζονταν σε κλίβανο στους 37°C. Τα κύτταρα ελεγχόταν σε καθημερινή βάση με χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου διέλευσης φωτός ώστε να εξεταστεί η κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας από κύτταρα. Όταν η επιφάνεια της πλαστικής φλάσκας κυτταροκαλλιεργειών ήταν κατά 85 - 90% καλυμμένη, πραγματοποιούνταν ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο αναδιπλασιασμός ξεκινούσε με την απόρριψη του θρεπτικού μέσου από την φλάσκα και έπειτα ακολουθούσε η προσθήκη θρυψίνης και EDTA, ελαφριά ανάδευση και αφαίρεση του διαλύματος αυτού από την φλάσκα. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν μια δεύτερη πλύση με θρυψίνη – EDTA και τοποθέτηση της φλάσκας για 5 λεπτά για επώαση σε κλίβανο στους 37°C, ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Έπειτα, τα αποκολλημένα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε νέο θρεπτικό μέσο DMEM, με αναδεύσεις με τη χρήση πιπέτας ώστε να μαζευτούν τα κύτταρα σε ένα εναιώρημα στον πάτο της φλάσκας. Η συνολική ποσότητα του εναιωρήματος συλλεγόταν με τη χρήση πιπέτας και μοιράζονταν ισόποσα στην ίδια και σε μία νέα πλαστική φλάσκα κυτταροκαλλιεργειών. Τέλος, ακολουθούσε η προσθήκη επιπλέον θρεπτικού

μέσου DMEM (2% FBS) και στις δύο φλάσκες έως ότου το περιεχόμενο της κάθε φιάλης φτάσει τα 10 ml και η επώαση τους στους σε κλίβανο στους 37°C.

3.4 Πειραματικό ιικό στέλεχος

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε κλινικό στέλεχος ιού της γρίπης Α (ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟ»), το οποίο είχε προηγουμένως ταυτοποιηθεί μοριακά ως H1N1.

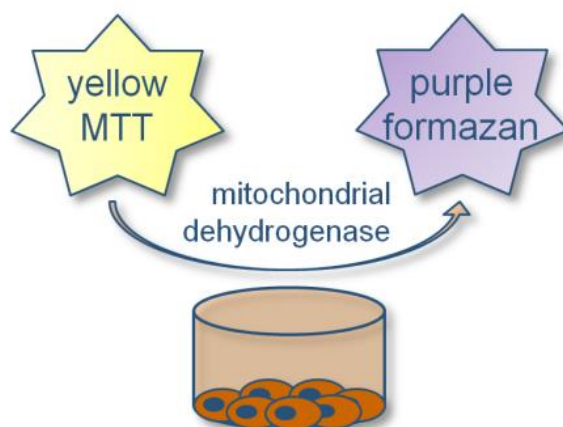
Αρχικά πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μολύνσεις του συγκεκριμένου στελέχους σε κύτταρα MDCKέτσι ώστε να αυξηθεί ο ιικός τίτλος, έως ότου να εμφανίζεται κυτταροπαθογόνος δράση 1 ημέρα μετά την μόλυνση. Η κυτταροκαλλιέργεια όπου παρατηρήθηκε η δράση αυτή, 1 ημέρα μετά τη μόλυνση, απομονώθηκε, δημιουργήθηκαν aliquots και τοποθετήθηκαν στους -80°C.

3.5 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας

3.5.1 Δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με MTT

Αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμασία η οποία είναι ικανή να ελέγχει την βιωσιμότητα των κυττάρων λοιπού γίνεται ποσοτικοποίηση των ενεργών μιτοχονδρίων στα υπό μελέτην κύτταρα.

Σαν βάση έχει μια αντίδραση, την ενζυμική αναγωγή του κίτρινου διαλύματος MTT (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ)-2-5-διφαινυλοτετραζόλιο) σε μία αδιάλυτη ένωση, τη φορμαζάνη, με τη δημιουργία κρυστάλλων μωβ χρώματος, μέσω των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών. Η μετατροπή αυτή αποτελεί ένδειξη μιτοχονδριακής ενεργότητας.



Εικόνα 5: Απεικόνιση της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT μέσω των αφυδρογονασών των μιτοχονδρίων.

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος MTT χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων μελισσόψωμου. Αρχικά, έγινε επίστρωση μίας πλάκας μικροπιλοποίησης 96 θέσεων με κύτταρα MDCK και θρεπτικό υλικό MEM συγκέντρωσης 2% FBS η οποία τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για μία μέρα. Η στήλη 12 της πλάκας έμεινε κενή καθώς χρησιμοποιείται ως τυφλό. Εφόσον παρατηρήθηκε επαρκής κάλυψη της πλάκας τοποθετήθηκαν οι αραιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και ακολούθησε επώαση (απόρριψη θρεπτικού υλικού). Στη στήλη 11 προστέθηκε μόνο με θρεπτικό υλικό με κύτταρα, χωρίς τα υπό μελέτη δείγματα για να λειτουργήσει ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης. Ακολουθούσε τοποθέτηση της πλάκας και επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Με την πάροδο αυτών των ωρών, έγινε προσθήκη 20μl (50ng) MTT σε όλα τα βοθρία της πλάκας η οποία επώαστηκε στους 37°C για 1,5 ώρα, ώστε να επέλθει δημιουργία των κρυστάλλων φορμαζάνης στα ενεργά κύτταρα. Εν συνεχεία, ακολούθησε προσθήκη 100μl διαλύματος SDS σε αραιό HCl για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν στα ενεργά κύτταρα αλλά και να ανασταλλεί πιθανή επιρροή ενός δείκτη που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο, ο οποίος θα επηρέαζε το χρώμα λόγω μείωσης του pH. Έτσι λοιπόν, οποιαδήποτε διαφοροποίηση εμφανιζόταν στα βοθρία της πλάκας θα είναι λόγω των κρυστάλλων φορμαζάνης. Η μέτρηση πραγματοποιείται με απορρόφηση σε μήκος κύματος 570nm. Από τις τιμές απορρόφησης που θα

προκύβουν, υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων για την εκάστοτη συγκέντρωση με τον εξής τύπο:

$$\% \text{ βιωσιμότητα} =$$

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

Συγκέντρωση
μελισσόψωμου

32mg/ml

16 mg/ml

8 mg/ml

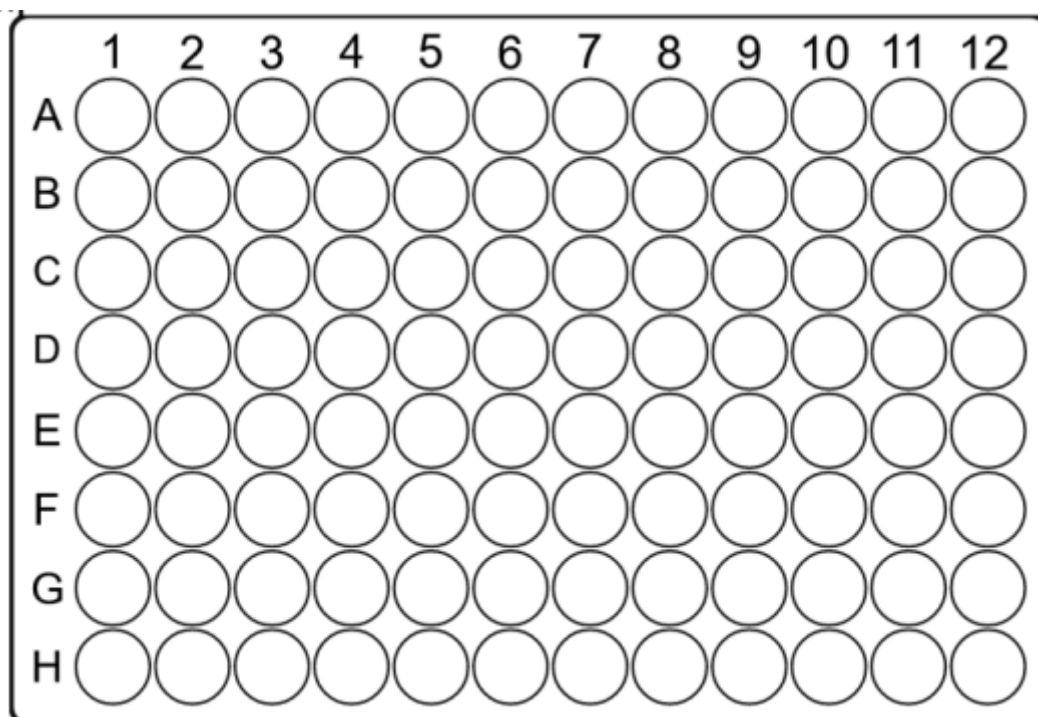
4 mg/ml

2 mg/ml

1 mg/ml

0.5 mg/ml

0.25 mg/ml



Εικόνα 6: Αναπαράσταση της διάταξης της πλάκας μικροτιλοποίησης για τη μέτρηση της τοξικότητας του μελισσόψωμου.

3.5.2 Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC₅₀)

Ο έλεγχος της τοξικότητας των κυττάρων πραγματοποιείται μέσα από τις τιμές CC₅₀ (Cytotoxic Concentration 50%). Πιο συγκεκριμένα, η τιμή αυτή χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την πιθανή ύπαρξη τοξικότητας και ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία θανατώνει το μισό (50%) των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια. Στο παρόν πείραμα, η τιμή CC₅₀ υπολογίζεται μέσω της μεθόδου MTT που αναλύθηκε πρωτίτερα.

Για τον σκοπό αυτό, ακολούθησε ο σχηματισμός μίας γραφικής παράστασης με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελισσόψωμου που χρησιμοποιήθηκαν και των τιμών που προήλθαν από την εφαρμογή του παραπάνω τύπου. Η εξίσωση που προκύπτει, Από την εξίσωση που προέκυψε μέσα από τη γραφική παράσταση, συντελεί στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των δειγμάτων όπου παρατηρείται καταστροφή στο ήμισυ των κυττάρων σε μια καλλιέργεια που δεν έχει μολυνθεί με ιό.

3.6 Έλεγχος αντι-ιικής δράσης

Ο έλεγχος της αντι-ιικής δράσης του κάθε δείγματος μελισσόψωμου θεωρείται η ικανότητα της παρεμπόδισης της καταστροφής των κυττάρων MDCK από τον ιό. Στο συγκεκριμένο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ακολουθήθηκαν 3 διαφορετικοί τρόποι για τον έλεγχο της αντι-ιικής δράσης του προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα, τα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα που αναλύθηκαν ήταν τα εξής:

- I. Επώαση μελισσόψωμου με ιό της γρίπης A και ύστερα προσθήκη κυττάρων MDCK. Η επώαση των δειγμάτων παρουσία θρεπτικού D-MEM με τον ιό πραγματοποιήθηκε, ώστε να γίνει κατανοητό αν και κατά πόσο το μελισσόψωμο και η γύρη επιδρούν πάνω στον ιόαπουσία κυττάρων.
- II. Επώαση μελισσόψωμου με κύτταρα MDCK και ύστερα προσθήκη του ιού της γρίπης A. Εδώ, αρχικά τοποθετήθηκε στην πλάκα κυτταροκαλλιέργειας ποσότητα δείγματος με ταυτόχρονη προσθήκη της κυτταρικής σειράς MDCK έτσι ώστε να γίνει κατανοητό αν το μελισσόψωμο και η γύρη είχαν επίδραση πάνω στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, επώαστηκαν στους 37°C , και στη συνέχεια προστέθηκε ο ιός.
- III. Επώαση ιού της γρίπης A με κύτταρα MDCK και τέλος προσθήκη του μελισσόψωμου 1 ώρα μετά την μόλυνση. Μ' αυτό το πρωτόκολλο προσπάθησε να γίνει κατανοητό αν το προϊόν, το μελισσόψωμο και η

γύρη, αν έχουν μεταγενέστερη δράση στα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα.

Σε όλα τα παραπάνω πρωτόκολλα, ακολουθήθηκε καθημερινή παρακολούθηση των πλακών για την εμφάνιση αντι-ϊικής δράσης, μέχρι και την ολική καταστροφή των κυττάρων στη στήλη του V.C

Πιο αναλυτικά, αρχικά έγινε επίστρωση μίας πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων με κύτταρα MDCK (100μl ανά βοθρίο) και εν συνεχεία ενοφθαλμίστηκε ισόποση ποσότητα ιού (100 μl) και στις 96 θέσεις εκτός του cell control που ήταν οι στήλες 1 και 12. Το CC περιείχε θρεπτικό υλικό MEM 100μl. Οι στήλες 10 και 11 περιείχαν κύτταρα MDCK μολυσμένα με ιό και αποτέλεσαν το θετικό control (VC). Επιπλέον τοποθετήθηκαν 100μl των διαφορετικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε κατάλληλη χρονική στιγμή (ταυτόχρονα με τον ιό, πριν τον ιό και μια ώρα μετά την μόλυνση των κυττάρων με ιό).

Ακολούθησε επώαση για μία ώρα στους 37°C, ώστε να καταφέρει ο ιός να διεισδύσει στα κύτταρα, και με το πέρας της μίας ώρας, τοποθετήθηκαν τα δείγματα στα βοθρία. Η παρατήρηση της πλάκας γινόταν σε καθημερινή βάση, ωστόσο φανεί ολική καταστροφή των κυττάρων στο V.C.

Συγκέντρωση
μελισσόψωμου

32 mg/ml

16 mg/ml

8mg/ml

4mg/ml

2mg/ml

1mg/ml

0,5mg/ml

0,25mg/ml

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

CC

ΔΕΙΓΜΑ

VC VC

CC

Εικόνα 7: Αναπαράσταση της διάταξης της πλάκας μικροπιλοποίησης για τον έλεγχο της αντιικής δράσης των δειγμάτων.

3.7 Εκχύλιση ιϊκού RNA

Για την απομόνωση του RNA του ιού χρησιμοποιήθηκαν erpendorf όγκου 2ml. Εκεί προστέθηκαν 10μl γλυκογόνο συγκέντρωσης 5ng/ml, 300μl Lysis Buffer (GuSCN) και 100μl από την καλλιέργεια του ιού. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος και επώαση του σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20°C), ανάδευση των erpendorf (vortex) και η τοποθέτηση τους στους -20°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο στα 14.000 rcf για 10 λεπτά, έγινε σχηματισμός ιζήματος το οποίο διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο το οποίο απορρίφθηκε. Το ίζημα (πέλετ) διαλυτοποιήθηκε σε 500μl αιθανόλης 70%, αναδεύτηκε (vortex) και φυγοκεντρήθηκε στα 14.000rcf για 10 λεπτά. Τέλος, απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό, έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 100μl ddH₂O, ακολούθησε ανάδευση (vortex), και αποθήκευση του δείγματος στους -20°C.

3.8 Αντίστροφη μεταγραφή

Ο ιός της γρίπης A διαθέτει 8 αρνητικής πολικότητας, μονόκλωνα γονιδιακά τμήματα ιϊκού RNA ως γενετικό υλικό. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η μετατροπή του RNA σε DNA, ώστε να μπορέσει στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ενίσχυση συγκεκριμένης περιοχής του ιϊκού γονιδιώματος με την χρήση της Real-Time PCR τεχνικής. Η μετατροπή του RNA σε DNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και περιλαμβάνει τη

δημιουργία ενός μονόκλωνου cDNA μορίου το οποίο θα χρησιμοποιήσει η DNA πολυμεράση για τη σύνθεση του δίκλωνου μορίου DNA.

Για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής M30F2/08 σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μικαι τελικό όγκο 1μl.

Για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, αρχικά ετοιμάζεται το πρώτο μείγμα M1 που περιλαμβάνει 5pmol εκκινητή, 40mMdNTPs και 4μl dH₂O. Στη συνέχεια, από αυτό το μείγμα προστίθενται 7 μl σε erpendorf των 0,5 ml μαζί με 5 μl RNA του κάθε δείγματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf-Mastercycler, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA, και τέλος τοποθέτηση τους στον πάγο. Έπειτα, ετοιμάζεται το δεύτερο δείγμα M2, όπου τοποθετείται 1.5 μl dH₂O, 1X FastGeneBuffer, 0.01mM DTT, 200U RT Fast Gene Scriptase II (NIPPON Genetics). Τέλος, 8μl από το μίγμα 2, προστίθενται σε κάθε δείγμα RNA/M1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση και δύο διαδοχικές επώσεις, η 1η στους 42°C για 50 λεπτά, ώστε να γίνει σύνθεση του cDNA και η 2η στους 70°C για 15 λεπτά ώστε να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή.

3.9 Real – TimePCR

Η Real-Time PCR (rt-PCR) ή αλλιώς ποσοτική PCR (qPCR) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο, μιας αλληλουχίας-στόχου σε ένα δείγμα. Συγκριτικά με την συμβατική μέθοδο PCR, το πλεονέκτημα της rt-PCR είναι ότι προσφέρει και ποιοτικά (ύπαρξη ή όχι του DNA-στόχου) αλλά και ποσοτικά (αριθμός αντιγράφων) αποτελέσματα, καθώς έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει τον αρχικό αριθμό αντιγράφων DNA- στόχου κατά την αντίδραση. Στην Real-Time PCR χρησιμοποιείται 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. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης κι φαίνεται σε ένα σχεδιάγραμμα (AmplificationPlot) το οποίο βοηθάει στην

ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Το AmplificationPlot απεικονίζει τη μεταβολή του φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε συνάρτηση με τον αριθμό κύκλων της αντίδρασης και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της τιμής Ct (thresholdcycle). Η τιμή Ct είναι ο πρώτος κύκλος στον οποίο ο φθορισμός του προϊόντος που ανιχνεύεται ξεπερνάει το κατώφλι (threshold). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικό δείγμα, τόσο μικρότερη θα είναι η τιμή Ct δηλαδή τόσο πιο νωρίς η ανιχνεύσιμη ποσότητα θα ξεπερνάει το κατώφλι.

Για την Real-Time PCR, χρησιμοποιήθηκε το FastGeneMix 2X (Nippon Genetics Europe) το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα στοιχεία που απαιτούνται για την rt-PCR. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένοι εκκινητές M30F2 (sequence: ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG) και M264R3 (sequence: TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG) (10 pmol) καθώς σύμφωνα με τον ΠΟΥ (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) έχουν αποδειχθεί ευρέως αποτελεσματικοί για την ταυτοποίηση ιών της γρίπης Α όταν χρησιμοποιούνται με τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 50 nM ROX Low, που χρησιμεύει ως παθητική χρωστική για την κανονικοποίηση του φθορίζοντος σήματος. Τέλος, προστέθηκε ddH₂O για τελικό όγκο 17 μl. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 3 μl από κάθε δείγμα και 17 μl από το μίγμα που προετοιμάστηκε, προστέθηκαν σε Eppendorf των 200 μl. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό, για να επιβεβαιωθεί πως δεν υπάρχει επιμόλυνση στα δείγματα.

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε συσκευή MxPro 3005P στις εξής συνθήκες:

- στους 95°C για 2 min (1 κύκλος) όπου πραγματοποιείται η αρχική αποδιάταξη του DNA

Ακολουθήσαν 40 κύκλοι

- στους 95°C για 5 sec για την αποδιάταξη του DNA
- στους 60°C για 30 sec για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
- Και τέλος στους 55°C-95°C για τη δημιουργία της καμπύλης τήξης (Dissociation Curve)

3. 10 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀)

Ως ανασταλτική συγκέντρωση 50% ή αλλιώς IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση μιας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή κατά το ήμισυ (50%) μιας απόκρισης, *in vitro*. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο υπολογισμός της τιμής IC₅₀ μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τη μικρότερη συγκέντρωση των δειγμάτων μελισσόψωμου και γύρης, στην οποία αναστέλλεται κατά 50% το σύνολο των ιικών αντιγράφων. Η τιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της αντι-ιικής δράσης των υπό μελέτη δειγμάτων. Για τον υπολογισμό της τιμής αυτής, χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την τεχνική της Real-Time PCR (qPCR), στην οποία υπολογίζονται τα αντίγραφα του ιού στο κάθε δείγμα. Η μέτρηση της μεταβολής των αντιγράφων των ιοσωματίων γίνεται συγκριτικά με το virus control (V.C.) μέσω της τιμής Ct (Cyclethreshold) στην παρακάτω εξίσωση:

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

Ουσιαστικά, αναλύεται η μεταβολή των ιικών αντιγράφων στο κάθε δείγμα, σε σχέση με τον αριθμό αντιγράφων που περιέχεται στον θετικό μάρτυρα, το virus control αποτελείται μόνο από κύτταρα ενοφθαλμισμένα με το ιικό στέλεχος του ιού της γρίπης Α. Το V.C. αναμένεται να έχει τα περισσότερα ιικά αντίγραφα, συνεπώς και το χαμηλότερο Ct στην qPCR. Από την άλλη, τα υπό μελέτη δείγματα αναμένεται να έχουν χαμηλότερο αριθμό ιικών αντιγράφων εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης των δειγμάτων μελισσόψωμου που εξετάστηκαν, αλλά θα έχουν υψηλότερες τιμές Ct σε σχέση με αυτή θετικού μάρτυρα (V.C.). Από τις τιμές που προκύπτουν σχεδιάζεται γραφική παράσταση συγκέντρωσης – ποσοστού αναστολής, και από την εξίσωση που προκύπτει η ευθεία 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 ιϊκή μόλυνση, χωρίς να προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας SI, τόσο πιο αποτελεσματική και ασφαλής για χρήση σε θεραπεία ιϊκής μόλυνσης είναι η υπό μελέτη ουσία. Με τη χρήση του δείκτη SI λαμβάνονται υπόψη τόσο οι τιμές IC₅₀ όσο και οι τιμές CC₅₀, με στόχο να βρεθεί το δείγμα με τη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για την καταπολέμηση του ιού. Συνεπώς, ένας υψηλός δείκτης SI δείχνει πως η αντι-ιϊκή δράση ενός δείγματος οφείλεται στην αναστολή που προκαλεί η ουσία στον ιό και όχι στον θάνατο των κυττάρων λόγω τοξικότητας αυτής της ουσίας.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός κυτταρικής τοξικότητας και τιμές CC_{50}

Όπως προαναφέρθηκε, για την εκτίμηση του επιπέδου της κυτταροτοξικής δράσης κάθε δείγματος είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η τιμή CC_{50} για το κάθε δείγμα, δηλαδή σε ποια συγκέντρωση καταστρέφεται το 50% των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια. Τα αποτελέσματα των τιμών CC_{50} των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2:

	Όνομα δείγματος	CC_{50} (mg/ml)
Μελισσόψωμο	1	4,88
	4	0,83
	6Γ	0,47
Πρωτεϊνικό κλάσμα	1	32
	4	7,45
	6Γ	3,92

Πίνακας 2: Δείγματα μελισσόψωμου και γύρης και οι τιμές CC_{50} .

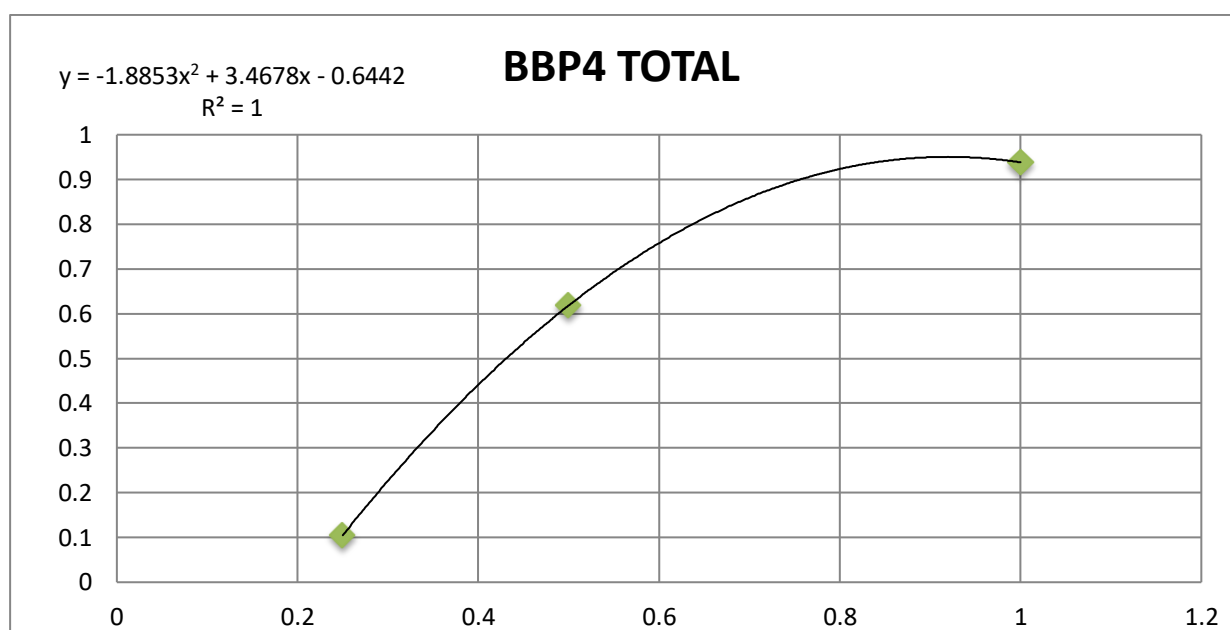
Με βάση τις παραπάνω τιμές το δείγμα 1 εμφανίζει τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα καθώς έχει τη μεγαλύτερη τιμή CC_{50} , δηλαδή απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση του, για να εμφανίσει σημαντική κυτταροτοξική δράση.

4.2 Αντι-ιική δράση και IC_{50}

Για την εύρεση των τιμών IC_{50} έγινε εκχύλιση και απομόνωση του ιικού RNA, μετατροπή του RNA σε cDNA, μέσω της αντίστροφης μεταγραφής και τέλος πραγματοποίηση real-time PCR. Τα αποτελέσματα της PCR των δειγμάτων

εκφράζονται ως μεταβολή του αριθμού των ιικών αντιγράφων συγκριτικά με τον θετικό μάρτυρα. Όσο μεγαλύτερη είναι η μείωση των αντιγράφων τόσο πιο αποτελεσματικά το δείγμα αναστέλλει τον ιό. Στον θετικό μάρτυρα η μείωση είναι μηδενική.

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



Εικόνα 7: Υπολογισμός του IC_{50} μέσω των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR

Η παραπάνω γραφική παράσταση αποτελεί παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο έγινε ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} για το δείγμα 4 όσον αφορά το πρωτεϊνικό του κομμάτι και πιο συγκεκριμένα το ολικό μέρος αυτού, με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την Real-Time PCR.

		Όνομασία δείγματος	IC ₅₀ (mg/ml)
Μελισσόψωμο + ιός	Μελισσόψωμο	1	0,156
		4	0,18
		6Γ	0,42
	Πρωτεϊνικό κλάσμα	1	0,097
		4	0,022
		6Γ	0,052

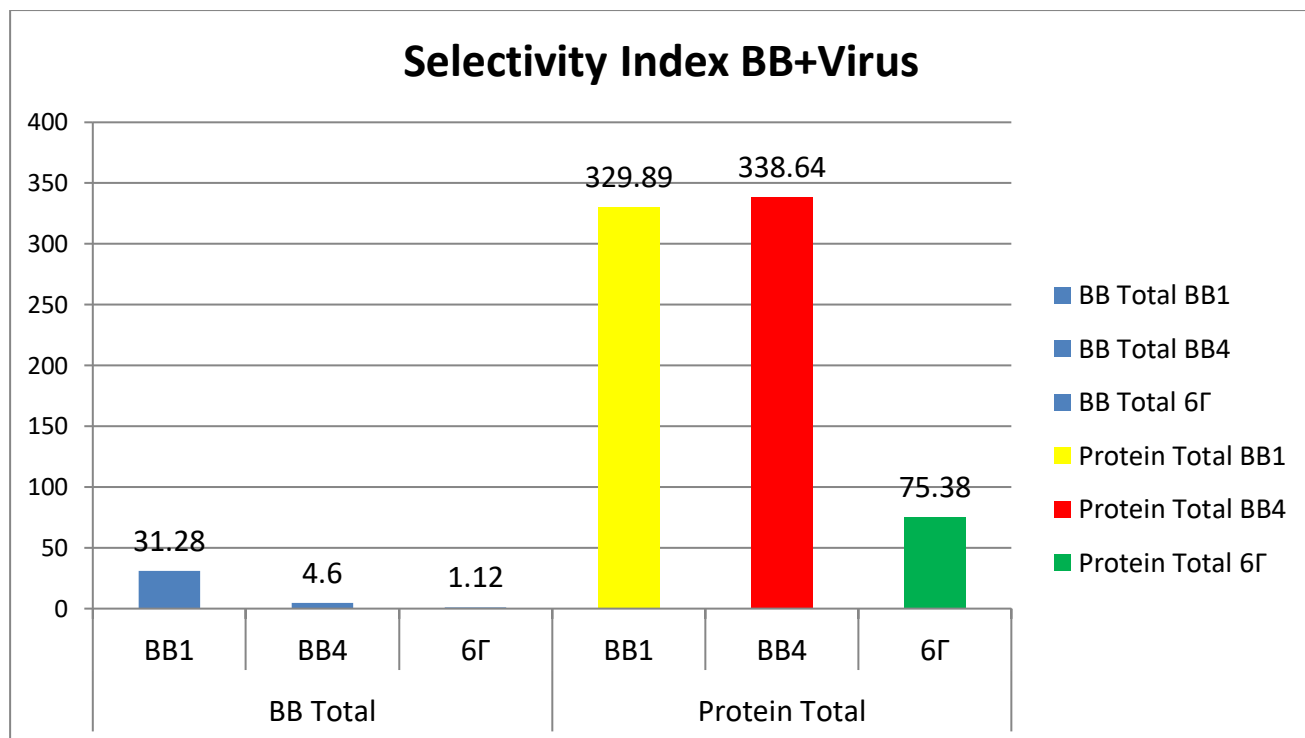
Πίνακας 3: Δείγματα μελισσόψωμου και γύρης (δείγμα και ιός) και οι αντίστοιχες τιμές τους IC₅₀.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, είναι φανερό ότι το πρωτεϊνικό κομμάτι των δειγμάτων που μελετήθηκαν, είναι αυτό που παρέχει την μεγαλύτερη αντι-ϊική δράση, καθώς οι τιμές IC₅₀, είναι αρκετά χαμηλές. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα 4 φαίνεται να είναι αυτό με την μεγαλύτερη αντι-ϊική δράση, καθώς οι τιμές της ανασταλτικής συγκέντρωσης που παρουσιάζονται είναι αρκετά χαμηλές ακόμη και συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μελέτη του υπερκείμενου εκχυλίσματος των δειγμάτων, δεν έδειξε ανασταλτική δράση και γι' αυτόν τον λόγο δεν υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀. Επίσης, η επώαση μελισσόψωμου και κυττάρων και η επώαση ιού και κυττάρων και έπειτα προσθήκη μελισσόψωμου δεν έδειξαν καμιά αντι-ϊική δράση σαν πρωτόκολλα, καθώς το Ct τους ήταν ίδιο με το Ct του Virus Control.

4.3 Selectivity Index

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 3.11, ο δείκτης επιλεκτικότητας SI, υπολογίζεται από τον λόγο της τιμής CC₅₀ προς την τιμή IC₅₀ του κάθε δείγματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του δείκτη SI, τόσο καλύτερη είναι η δράση του υπό μελέτη δείγματος, καθώς είναι ικανό να μειώσει τα ιικά

αντίγραφα χωρίς να προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι τιμές SI για τα υπό μελέτη δείγματα.



Εικόνα 8: Διαγραμματική απεικόνιση των τιμών SI των δειγμάτων κατά την επώαση μελισσόψωμου και ιού.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα, οι υψηλότερες τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας, εμφανίζονται στο πρωτεϊνικό κομμάτι των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη τιμή SI που εμφανίστηκε έλαβε την τιμή 338,64, και ανήκει στο δείγμα 4 στο πρωτεϊνικό κλάσμα. Αυτό σημαίνει πως το πρωτεϊνικό κλάσμα των δειγμάτων που μελετήθηκαν, εμφανίζει πολύ καλή αντι-ϊική δράση έναντι του ιού της γρίπης A, χωρίς να εμφανίζει κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων MDCK. Τα περισσότερα δείγματα γενικότερα, έδειξαν τιμή SI υψηλότερη από 1, που σημαίνει ότι η ιική αναστολή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις χωρίς να προκαλεί τοξικότητα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα προϊόντα κυψέλης θεωρούνται μεγάλης σημασίας, καθώς προσφέρουν ωφέλιμες ιδιότητες στην υγεία, δρώντας τόσο θεραπευτικά, όσο και προληπτικά (Bakour, M., *etal.*,2022).Από αυτά τα προϊόντα, αυτό που ξεχωρίζει ιδιαίτερα για τις ιδιότητες του, είναι το μελισσόψωμο, ένα προϊόν ζύμωσης (Bakour, M., *etal.*,2019). Γενικότερα, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να έχουν αξιολογήσει τις ιδιότητες του συγκεκριμένου προϊόντος. Μέσα από τις υπάρχουσες αυτές μελέτες έδειξε πως συμβάλλει σε μεγάλο αριθμό μολύνσεων. Αυτές τις ιδιότητες τις οφείλει κυρίως σε ουσίες όπως τα φλαβονοειδή, οι πολυφαινόλες, τα οργανικά οξέα κ.α.(Bakour., M., *etal.*, 2017).

Η αντιβακτηριακή δράση του μελισσόψωμου έχει μελετηθεί αρκετά σε σύγκριση με την αντι-ιική δράση του, η οποία βρίσκεται σε αρχικά επίπεδα έρευνας. Πιο συγκεκριμένα, το μελισσόψωμο όπως και η γύρη, αποτελούν σημαντικά και πολλά υποσχόμενα αντιμικροβιακά μέσα έναντι βακτηρίων και άλλων παθογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ιών. Ωστόσο, οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες ποικίλουν ανάλογα την χημική σύνθεση που σχετίζεται άμεσα με τη βοτανική προέλευση της γύρης. Επιπλέον, το μελισσόψωμο φαίνεται να επιδεικνύει επιλεκτική αντιμικροβιακή δράση που είναι συνήθως υψηλότερη έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων (Didaras, N. A.,*etal.*, 2020). Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει πως το μελισσόψωμο τόσο το ελληνικό (Didaras, N. A.*etal.*, 2021) όσο και το μαροκινό (BakourM., *etal.*, 2019), εμφάνισαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι σημαντικών παθογόνων όπως *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*.

Επιπλέον, το μελισσόψωμο και η γύρη έχουν δείξει να έχουν και αντι-ιική δράση. Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατη και μοναδική μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί από τους (Didaras *etal.*, 2022) είχε σαν σκοπό την μελέτη της αντι-ιικής δράσης του συγκεκριμένου προϊόντος έναντι του εντεροϊού D68, και έδειξε πως ασκείται σημαντική αντι-ιική δράση έναντι του ιού , χωρίς να δημιουργείται κυτταροτοξικότητα.

Ο ιός της γρίπης Α, ανήκει στην οικογένεια των Orthomyxoviridae (Dou, D., *etal.*, 2018)., και είναι ικανός να προκαλέσει σοβαρό πρόβλημα υγείας στον ανθρώπινο οργανισμό, πλήττοντας το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, προκαλώντας ακόμη και θάνατο (WHO, 2018). Το 1918, ξέσπασε το πιο καταστροφικό συμβάν μολυσματικής νόσου στην μέχρι τώρα καταγεγραμμένη ιστορία: την πανδημία γρίπης. Από το 1918 έχουν εμφανιστεί ακόμη τρεις πανδημίες, το 1957, το 1968 και το 2009. Ο κίνδυνος μετάδοσης ενός ιού γρίπης από τα ζώα στον άνθρωπο είναι υπαρκτός και λαμβάνεται ως προειδοποίηση πως πρέπει να αναπτυχθούν νέα εργαλεία για την αντιμετώπιση του ιού. Κάθε χρόνο, υπολογίζεται ότι υπάρχουν 1 δισεκατομμύριο κρούσματα, εκ των οποίων τα 290.000 έως 650.000 αντιπροσωπεύουν θανάτους από αναπνευστικά προβλήματα (WHO, 2019).

Η αντιμετώπιση του βασίζεται στον εμβολιασμό (Nuwarda, RF., *etal.*, 2021), και στην χρήση ουσιών που αναστέλλουν την νευραμινιδάση (Relenza&Tamiflu, αντίστοιχα)(De Clercq, E., 2007) και την δράση στο κανάλι πρωτονίων M2 του ιού (Intharather, P., *etal.*, 2008).

Παρ' όλα αυτά, μελέτες αναφέρουν ότι ιοί της εποχικής γρίπης Α, βρέθηκαν ανθεκτικοί έναντι στην οσελταμιβίρη. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν από εννέα από τα 50 παιδιά (18%) της Ιαπωνίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με oseltamivir (KisoM., *etal.*, 2004). Επιπλέον, έχει αναφερθεί εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στην οσελταμιβίρη, του ιού H1N1 κατά το έτος 2009, εντός 48 ωρών από την έναρξη της θεραπείας με Relenza (Inoue M, *etal.*, 2009). Ακόμη, έχει αναφερθεί παρατεταμένη αποβολή ανθεκτικού ιού γρίπης Α στην οσελταμιβίρη και ζαναμιβίρη, από σοβαρά ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ακόμη και μετά τη διακοπή της θεραπείας(IsonMG, *etal.*, 2006). Φαίνεται λοιπόν, πως ο ιός έχει μεταβαλλόμενα χαρακτηριστικά, και μπορεί να αποκτά ανθεκτικότητα έναντι των συγκεκριμένων ουσιών. Γι' αυτό κρίνεται σκόπιμη η έρευνα και η ανακάλυψη νέων εργαλείων με αντι-ϊική δυνατότητα. Στην παρούσα μελέτη, γίνεται μια προσπάθεια να διερευνηθεί η αντι-ϊική δράση του ελληνικού μελισσόψωμου έναντι του ιού της γρίπης Α, αλλά και του μηχανισμού άσκησης αυτής της δράσης. Το κάθε δείγμα μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξική και ως προς την αντι-ϊική δράση του, σε συγκεντρώσεις 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 mg/ml. Ειδικότερα, για τον έλεγχο της

κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT, και υπολογίστηκαν οι τιμές CC_{50} . Ταυτόχρονα, για τον έλεγχο της αντι-ιικής δράσης, πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα, ώστε να ελεγχθεί ταυτόχρονα και ο μηχανισμός της δράσης αυτής. Εφόσον πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων σε θρεπτικό μέσο D- MEM, πρώτα τοποθετήθηκε για επώαση το μελισσόψωμο με τον ιό της γρίπης A και ύστερα έγινε η προσθήκη των κυττάρων MDCK. Δεύτερον, ακολούθησε η επώαση του μελισσόψωμου με κύτταρα MDCK και ύστερα η προσθήκη του ιού της γρίπης A, και τέλος ακολούθησε η επώαση του ιού με κύτταρα MDCK και έπειτα η προσθήκη του μελισσόψωμου (1 ώρα μετά την μόλυνση). Εν συνεχεία ακολούθησαν πρωτόκολλα αντίστροφης μεταγραφής για μετατροπή του RNA σε DNA και έπειτα πραγματοποιήθηκε rt PCR, όπου και υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} , η οποία αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ενός δείγματος μελισσόψωμου στην οποία προκαλείται μείωση του ιικού τίτλου κατά 50%. Για την αναστολή του ιού της γρίπης A, τις μικρότερες τιμές IC_{50} , έδειξε το δείγμα 4 και συγκεκριμένα το πρωτεϊνικό κλάσμα. Γενικά, για να θεωρηθεί ένα δείγμα ιδανικό ως προς την αντι-ιική δράση του πρέπει να έχει υψηλή τιμή CC_{50} και χαμηλή τιμή IC_{50} (υψηλό δείκτη SI) καθώς η πρώτη υποδεικνύει χαμηλή κυτταροτοξική δράση ενώ η δεύτερη υποδεικνύει ότι επιτυγχάνει να μειώσει σε σημαντικό ποσοστό τον ιικό τίτλο του ιού σε μικρή συγκέντρωση.

Με βάση τις τιμές CC_{50} και IC_{50} (δείκτης επιλεκτικότητας) που υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το δείγμα 4 με τιμή SI 338,64 εμφανίζει την ισχυρότερη αντι-ιική δράση στο πρωτεϊνικό κυρίως κλάσμα.

Επομένως, συμπεραίνουμε ότι τα δείγματα μελισσόψωμου εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με το δείγμα γύρης (αρχικό προϊόν) καθώς εμφανίζουν μεγάλη αντι-ιική δράση έναντι του ιού της γρίπης A και παράλληλα υψηλή προστατευτική δράση στην κυτταρική σειρά MDCK. Επιπλέον, το πρωτεϊνικό κλάσμα των δειγμάτων μελισσόψωμου φαίνεται να έχει πολύ καλύτερη αντι-ιική δράση, συγκριτικά με το ολικό δείγμα, καθώς οι τιμές του δείκτη επιλεκτικότητας είναι αρκετά υψηλές.

Όσον αφορά τον μηχανισμό άσκησης της αντι-ιικής δράσης ο μόνος τρόπος που έδειξε δράση απέναντι στον ιό, είναι κατά την επώαση του ιού με τα δείγματα μελισσόψωμου. Έτσι, υποθέτουμε πως το μελισσόψωμο αλληλεπιδρά με μόρια του ιού όπως η αιμοσυγκολλητίνη, που παίζουν ρόλο κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Οι δύο άλλοι τρόποι επώασης, δηλαδή επώαση κυττάρων και ιού & επώαση κυττάρων και μελισσόψωμου δεν έδειξαν καμία αντι-ιική δράση.

Συνοψίζοντας, με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από το παρόν πείραμα, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Το μελισσόψωμο παρέχει σημαντική αντι-ιική δράση, και συγκεκριμένα έναντι του ιού της γρίπης Α, κάτι που έχει φάνει και μέσα από πρόσφατη και μοναδική μελέτη έναντι του εντερικού D68
- Το μελισσόψωμο σαν προϊόν έχει σημαντική αντι-ιική δράση, η οποία εντοπίζεται με μεγάλη διαφορά κυρίως στο πρωτεϊνικό κλάσμα του
- Το μελισσόψωμο συγκριτικά με τη γύρη (πρώτη ύλη για τη δημιουργία του BB) έδειξε να έχει σαν τελικό ζυμώμενο προϊόν καλύτερη αντι-ιική δράση σε σχέση με το αρχικό (γύρη). Περισσότερα δείγματα όμως πρέπει να εξεταστούν
- Πιθανότατα, ο μηχανισμός άσκησης αυτής της αντι-ιικής δράσης συμβαίνει κατά την επώαση του BB με τον ιό, που σημαίνει πως θα μπορούσε να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ BB και μορίων ιού. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά είναι πιθανόν να παίζουν ρόλο κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο (αιμοσυγκολλητίνη).

Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω επιστημονική μελέτη της δράσης του συγκεκριμένου προϊόντος, καθώς και η διερεύνηση της αντι-ιικής του δράσης έναντι και άλλων ιών επικίνδυνων για την δημόσια υγεία.

BIBΛIOΓPAΦIA

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Bakour, M., Al-Waili, N. S., El Menyiy, N., Imtara, H., Figuera, A. C., Al-Waili, T., & Lyoussi, B. (2017). *Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity*. *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4205–4212. doi:10.1007/s13197-017-2889-9
- Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R., & Badiayoussi. (2019). *Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties*. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2019.02.008
- Bakour, M.; Laaroussi, H.; Ousaaid, D.; El Ghouzi, A.; Es-Safi, I.; Mechchate, H.; Lyoussi, B. Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* 2022, 11, 203. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020203> Academic Editor: Piotr Szweda Received: 12 January 2022 Accepted: 31 January 2022 Published: 5 February 2022
- Borawska, M. H., Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Moskwa, J., Bartosiuk, E., Socha, K., ... Mariak, Z. (2014). *The Interaction of Bee Products With Temozolomide in Human Diffuse Astrocytoma, Glioblastoma Multiforme and Astroglia Cell Lines*. *Nutrition and Cancer*, 66(7), 1247–1256. doi:10.1080/01635581.2014.951735
- Couch RB. Orthomyxoviruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 58. PMID: 21413353.
- De Clercq, E. (2007). *Viruses and Viral Diseases*. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 253–293. doi:10.1016/b0-08-045044-x/00211-x
- Didaras, N.A.; Dimitriou, T.; Daskou, M.; Karatasou, K.; Mossialos, D. In vitro assessment of the antiviral activity of Greek bee bread and bee

collected pollen against enterovirus D68. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2021, 20, e4859.

- Didaras, N. A., Kafantaris, I., Dimitriou, T. G., Mitsagga, C., Karatasou, K., Giavasis, I., ... Mossialos, D. (2021). *Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. Antibiotics*, 10(5), 555. doi:10.3390/antibiotics10050555
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., & Daniels, R. (2018). *Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01581
- Dreitlein, W. B., Maratos, J., & Brocavich, J. (2001). *Zanamivir and oseltamivir: two new options for the treatment and prevention of influenza. Clinical Therapeutics*, 23(3), 327–355. doi:10.1016/s0149-2918(01)80042-4
- Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2010). *Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28403–28409. doi:10.1074/jbc.r110.129809
- Gilliam M. (1979) Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie* 10(1): 43-53. DOI: 10.1051/apido:19790106
- Hussain, M., Galvin, H., Haw, T. Y., Nutsford, A., & Husain, M. (2017). *Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. Infection and Drug Resistance*, Volume 10, 121–134. doi:10.2147/idr.s105473
- Inoue M, Barkham T, Leo YS, et al. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus within 48 hours. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1633–6
- Intharathep, P., Laohpongspaisan, C., Rungrotmongkol, T., Loisuangsinsin, A., Malaisree, M., Decha, P., ... Hannongbua, S. (2008). *How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel. Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27(3), 342–348. doi:10.1016/j.jmglm.2008.06.002 doi:10.1016/j.jmglm.2008.06.002

- 7. Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, et al. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J Infect Dis* 2006;193:760–4.
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). *Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. Trends in Food Science & Technology, 71, 170–180.* doi:10.1016/j.tifs.2017.10.021
- Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004;364:759–65.
- Lima, W. G., Brito, J. C. M., & Cruz Nizer, W. S. (2020). *Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID -19 (SARS-CoV-2). Phytotherapy Research, 35(2), 743–750.* doi:10.1002/ptr.6872
- Mărgăoan, R., Stranț, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Cornea-Cipcigan, M., ... Vodnar, D. C. (2019). *Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. Antioxidants, 8(12), 568.* doi:10.3390/antiox8120568
- Markiewicz-Zukowska, R.; Naliwajko, S.K.; Bartosiuk, E.; Moskwa, J.; Isidorov, V.; Soroczyńska, J.; Borawska, M.H. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Beebread, and Its Influence on the Glioblastoma Cell Line (U87MG). *J. Apic. Sci.* 2013, 57, 147–157.
- Masoura, M., Passaretti, P., Overton, T. W., Lund, P. A., & Gkatzionis, K. (2020). Use of a model to understand the synergies underlying the antibacterial mechanism of H₂O₂-producing honeys. *Scientific reports, 10(1), 17692.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74937-6>
- Nagai, T.; Nagashima, T.; Myoda, T.; Inoue, R. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 226–229.
- Nuwarda, Rina Fajri & Alharbi, Abdulsalam & Kayser, Veysel. (2021). An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines. 9.* 1032. 10.3390/vaccines9091032.

- Parniak M.A. ,Vergis E.N., Abram M.E., in [Encyclopedia of Respiratory Medicine](#), 2006
- Samji T. (2009). Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yalejournal of biology and medicine*, 82(4), 153–159.
- Wagner, R., Matrosovich, M., &Klenk, H.-D. (2002). *Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. Reviews in Medical Virology*, 12(3), 159–166. doi:10.1002/rmv.352
- Z. Abouda, I. Zerdani, I. Kalalou, M. Faid and M.T. Ahami, 2011. The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Microbiology*, 6: 376-384.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟΙΤΟΠΟΙ

- [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))
- [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))
- <https://www.eurofins.de/medizinprodukte-pruefungen/validierte-methoden/mtt-test/>
- https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/erotiseis_apantiseis_koino_gripi2018.pdf
- <https://www.cdc.gov/flu/prevent/keyfacts.htm>
- https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of-influenza-viruses/protocols_influenza_virus_detection_feb_2021.pdf?sfvrsn=df7d268a_5
- <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/8-things-to-know-about-pandemic-influenza>
- <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6001.pdf>