

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Εκτίμηση της επίδρασης δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες
οξειδοαναγωγικής κατάστασης μακροφάγων κυττάρων
ποντικού»

Πτυχιακή Εργασία
Φορτομάρη Τρυφονία του Νικολάου
Λάρισα, 2022

Τριμελής Επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αριστείδης Βεσκούκης

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

Μαρία Χαλαμπαλάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Δημήτριου Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών –Τοξικολογίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο εργαστήριό του, για την εμπιστοσύνη του, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Ακόμη, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Αριστείδη Βεσκούκη, για τις ουσιώδεις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια του πάνω στο αντικείμενο της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη, Επίκουρη καθηγήτρια του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Αναστασία Πατούνα, για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου για την προθυμία τους στο να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου και στο να μου μεταδώσουν πολύτιμες πληροφορίες καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου, την αδερφή μου και τους

στενούς μου φίλους για την αμέριστη ψυχική υποστήριξή τους και καθημερινή τους συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ιστορική αναδρομή μελιού	9
1.2 Ορισμός μελιού και διαδικασία παραγωγής	10
1.3 Είδη μελιού και προσδιορισμός ποιότητας	11
1.4 Οικονομικά στοιχεία.....	13
1.5 Σύσταση	14
1.5.1 Σάκχαρα.....	15
1.5.2 Οργανικά οξέα	15
1.5.3 Φαινολικές ενώσεις.....	16
1.5.4 Αμινοξέα.....	17
1.5.5 Μεταλλικά στοιχεία	18
1.5.6 Βιταμίνες	19
1.5.7 Ένζυμα	19
1.6 Χρήσεις μελιού.....	20
1.6.1 Γενικά.....	20
1.6.2 Μέλι και υγεία	21
1.7 Ελεύθερες ρίζες	24
1.8 Κατηγορίες δραστικών μορφών	25
1.9 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	27
1.9.1 Ενδογενείς πηγές.....	27
1.9.2 Εξωγενείς πηγές.....	29
1.10 Βιολογικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	29
1.10.1 Αρνητικές επιδράσεις.....	30
1.10.2 Θετικές επιδράσεις.....	31
1.11 Αντιοξειδωτικά.....	32
1.11.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα	33
1.11.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	35
1.12 Οξειδωτικό στρες.....	37
2. Σκοπός μελέτης	39

3. Υλικά και μέθοδοι.....	40
3.1 Προετοιμασία διαλυμάτων.....	40
3.2 Κυτταρική σειρά.....	40
3.3 Κυτταροκαλλιέργειες.....	41
3.4 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων μελιού	41
3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης.....	43
3.5.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford.....	44
3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με χρήση φασματοφωτομετρίας.....	45
3.5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με χρήση φασματοφωτομετρίας.....	47
3.5.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μέσω φασματοφωτομετρίας.....	49
3.5.5 Προσδιορισμός των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο μέσω κυτταρομετρία ροής.....	52
3.5.6 Προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) στο κύτταρο μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	53
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	55
4. Αποτελέσματα.....	56
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων μελιού στα RAW264.7.....	56
4.2 Προσδιορισμός των επιδράσεων των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7	57
5. Συζήτηση	60
Βιβλιογραφία.....	66

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια ο σύγχρονος τρόπος ζωής και οι διατροφικές συνήθειες που τον συνοδεύουν έχουν εγείρει πολλές ανησυχίες σχετικά με την υγεία του ανθρώπου. Για τον λόγο αυτό, ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των καταναλωτών έχει στρέψει το ενδιαφέρον του σε τρόφιμα τα οποία δεν θα διαθέτουν επιπρόσθετες χημικές ουσίες και δεν θα έχουν υποστεί μεγάλη επεξεργασία. Η προτίμηση του καταναλωτικού κοινού να επενδύει σε αυτού του είδους προϊόντα λόγω των ωφέλιμων συστατικών τους και η θέληση των παραγωγών να επεκταθούν στην αγορά καθιστά αναγκαία την εκτίμηση ορισμένων ιδιοτήτων των γεωργικών προϊόντων πρωτού αυτά κυκλοφορήσουν στην αγορά. Από αυτή την οπτική γωνία, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αποτίμηση των επιδράσεων δύο δειγμάτων μελιού, ενός μελιού βελανιδιάς και του μελιού *Eryngium creticum*, ή αλλιώς «Γαλάζιο αγκάθι», στην βιωσιμότητα και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις (3.125, 6.25, 12.5, και 25 mg/ml) των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού για 24 ώρες. Στην συνέχεια, έγινε εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης (TAC, TBARS και Protein carbonyls) με την χρήση κυτταρομετρίας ροής και φασματοφωτομετρίας. Παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στην κατάσταση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και στις δύο περιπτώσεις μέσω αξιολόγησης των επιδράσεων στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Η μελέτη των αποτελεσμάτων που προέκυψαν επισήμαναν την επαγωγή της λιπιδικής υπεροξειδωσης κατά την έκθεση των κυττάρων στις περισσότερες συγκεντρώσεις του μελιού βελανιδιάς, παρά την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Τέλος, το δεύτερο δείγμα μελιού, του *Eryngium creticum*, υπέδειξε σημαντικότερη αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις (3.125 mg/ml , 6.25 mg/ml).

Abstract

In recent years, the modern lifestyle adopted by mankind, along with the corresponding nutritional habits, have raised serious concerns regarding human health. For this particular reason, high percentage of the general public has directed attention to consumables that lack added chemical substances and great processing. This preference towards nutritional products containing beneficial ingredients, accompanied by the producers' will to expand their involvement in the market, marks the assessment of specific qualities of agricultural products as highly significant, especially prior to their addition to the public market. In this light, the present study aims to evaluate the effects of two honey samples, one derived from oak trees and the second one from *Eryngium creticum*, on viability and redox biomarkers of murine macrophages RAW264.7. For this purpose, cells were incubated with selected concentrations (3.125, 6.25, 12.5 and 25mg/ml) of the honey samples for 24 hours. Subsequently, redox biomarkers (TAC, Tbars and Protein carbonyls) were assessed by flow cytometry and spectrophotometry. Fluctuation of the redox balance was observed in both cases, through evaluation of the effects of the honey samples on the cells' redox biomarkers. Investigation of the results indicated induction of lipid peroxidation during exposure to the majority of the oak tree honey concentrations, despite of the activation of antioxidant's mechanism. Ultimately, the second honey sample, *Eryngium creticum*, displayed the most important antioxidant capacity at the two lower concentrations (3.125 and 6.25 mg/ml).

1. Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή μελιού

Από τους αρχαίους χρόνους, το μέλι χρησιμοποιείται στην διατροφή ως φυσικό γλυκαντικό αλλά προτείνεται και για την ευζωία, την ευεξία όπως και για την μακροβιότητα του ανθρώπου (Honey and obesity-related dysfunctions: a summary on health benefits). Η συλλογή του θεωρείται μια από τις αρχαιότερες πρακτικές καθώς το μέλι αποτελούσε την μόνη γνωστή φυσική γλυκαντική ουσία εκείνων των χρόνων. Μάλιστα, έχουν βρεθεί αναπαραστάσεις σε σπήλαια, όπως σε αυτό του Μπικόρπ της Ισπανίας, ηλικίας περίπου 8.000 χρόνων (Μεσολιθική εποχή) όπου απεικονίζεται η προσπάθεια δύο ατόμων να συλλέξουν μέλι από φωλιά άγριων μελισσών (Kuropatnicki et al., 2018).

Προχωρώντας από την «Μεσολιθική» στην «Εποχή του Χαλκού» (3.100 π.Χ - 1.100 π.Χ) , οι άνθρωποι αρχίζουν και λατρεύουν το μέλι ως «θεϊκή τροφή» λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Συγκεκριμένα, το μέλι αναφέρεται σε πολλά ιερά βιβλία της Κίνας, της Περσίας, της Ινδίας αλλά και της Αιγύπτου (Nikhat & Fazil, 2022). Το 3.100 π.Χ, οι Αιγύπτιοι συσχέτιζαν τις μέλισσες με θεούς ενώ συνήθιζαν να τις εκτρέφουν σε ναούς και τύμβους. Αυτό αποσκοπούσε όχι μόνο στην λατρεία των θεών αλλά και στην συλλογή του μελιού με στόχο την παραγωγή φαρμάκων και δερματικών αλοιφών. Την ίδια εποχή, καταγράφηκε σε παπύρους η συμβολή της συγκεκριμένης ουσίας στον περιορισμό των φλεγμονών κατά τις εγχειρήσεις (Kuropatnicki et al., 2018).

Η χρήση του μελιού σε μείγματα για την ίαση δερματικών παθήσεων και επούλωση πληγών γίνεται αργότερα γνωστή στους Σουμέριους όπως και στους Αρχαίους Έλληνες, με τον «Ιπποκράτη της Κω» να αναφέρεται στις θεραπευτικές του ιδιότητες. Ειδικότερα, ο αρχαίος Έλληνας ιατρός το χρησιμοποιούσε για την θεραπεία κατά του έλκους, ενώ το υδρόμελο και το οξύμελο, μείγματα αποτελούμενα από μέλι με νερό ή ξύδι αντίστοιχα, χρησιμοποιούνταν για τον κατευνασμό του βήχα (Orhan et al., 2022). Επίσης, ο αρχαίος Έλληνας φιλόσοφος Αριστοτέλης, τόνισε την συμβολή του μελιού στην απάλυνση των πόνων στους οφθαλμούς (Mandal & Mandal, 2011).

Στα χρόνια της Αναγέννησης (1510 – 1590), ο Ambroise Paré, διακεκριμένος χειρουργός και γνωστός για τις ανώδυνες θεραπείες τραυμάτων, αναγνωρίζει το μέλι ως ένα πολύ αποτελεσματικό φάρμακο για την θεραπεία του έλκους.

Φτάνοντας στα νεότερα χρόνια, από τον 20ο αιώνα έως και σήμερα, το μέλι χρησιμοποιείται ως ιατρικό, σε συνδυασμό με φαρμακευτικές θεραπείες έναντι πολλών παθήσεων και προβλημάτων υγείας (El-Kased et al., n.d.).

1.2 Ορισμός και διαδικασία παραγωγής μελιού

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό προϊόν της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής το οποίο χαρακτηρίζεται από την υψηλή διατροφική του αξία και την γλυκιά γεύση που προσδίδει ως φυσικό γλυκαντικό κατά την παρασκευή διαφόρων γλυκισμάτων και ποτών (Viteri et al., 2021). Η παχύρρευστη αυτή ουσία παρασκευάζεται από τις μέλισσες *Apis mellifera L.* κατόπιν συλλογής και επεξεργασίας νέκταρ ανθέων είτε από ζωικές ή/και φυτικές μελιτώδεις εκκρίσεις (μέλι μελιτώματος) (Bentabol Manzanares et al., 2011a). Αναλυτικότερα, για την παραγωγή του μελιού, η μέλισσα μετακινείται από άνθος σε άνθος και μετά τη συλλογή του νέκταρ (ή/και του μελιτώματος) ακολουθεί η πρώτη επεξεργασία μέσω πεπτικών ενζύμων του στομάχου του εντόμου με το πιο βασικό την ινβερτάση. Αυτά έχουν την ικανότητα να διασπούν την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη τα οποία είναι και οι βασικοί υδατάνθρακες του μελιού. Στο πρώτο στάδιο η υγρασία είναι περίπου στο 80%.

Ειδικότερα, μια μέλισσα μυρικά το νέκταρ για περίπου 20 λεπτά και έπειτα με μια διαδικασία παλινδρόμησης μεταφέρει το μείγμα σε επόμενη μέλισσα. Ακολούθως, το προϊόν αυτό μεταφέρεται από το στόμα του εντόμου στα τοιχώματα της κηρήθρας όπου στεγνώνεται με την κίνηση των φτερών τους μέχρι το μείγμα να φτάσει στην επιθυμητή υγρασία που είναι περίπου στο 16-17%. Μόλις η παραγωγή του μελιού ολοκληρωθεί, οι μέλισσες σφραγίζουν τις κυψελίδες με κερί, με στόχο την προστασία του. Καθ'όλη την διαδικασία η σύσταση του μείγματος μεταβάλλεται συνεχώς μέχρι να φτάσει στην τελική του μορφή (Ramsay et al., 2019).

1.3 Είδη μελιού και προσδιορισμός ποιότητας

Όσο αφορά τα είδη μελιού, υπάρχουν ορισμένα κριτήρια κατηγοριοποίησης. Ένα από αυτά αποτελεί η βοτανική προέλευση του, δηλαδή τα διάφορα είδη ανθέων από τα οποία έχει παραχθεί το μέλι (Hailu & Belay, 2020).

Επιπλέον, ανάλογα με την βοτανική προέλευση μεταβάλλεται και η χημική σύσταση του μελιού. Ως χημική σύσταση ορίζεται το σύνολο ορισμένων φυσικοχημικών παραγόντων όπως είναι η περιεκτικότητα των σακχάρων του μελιού, η περιεκτικότητα και η ενεργότητα του νερού, τα μεταλλικά στοιχεία και ηλεκτρική αγωγιμότητα (Schievano et al., 2016). Υπο φυσιολογικές συνθήκες παραγωγής, το κατεξοχήν μονοανθικό μέλι δεν υφίσταται. Συνήθως, αυτός ο χαρακτηρισμός αποδίδεται όταν η προέλευση του μελιού συσχετίζεται με ένα είδος άνθους σε ένα μεγάλο σχετικά ποσοστό. Όμως ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ένα μέλι ως μονοανθικό (Schievano et al., 2016).

Σχετικά με την ποιότητα μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών μελιού, το μονοανθικό θεωρείται ως μεγαλύτερης αξίας μέλι στην αγορά (Soares et al., 2017), όσον αφορά τον οικονομικό τομέα, λόγω του ότι παρέχει την δυνατότητα στους καταναλωτές να επιλέξουν το άρωμα και την γεύση της προτίμησής τους, γνωρίζοντας από ποιο άνθος έχει παραχθεί το προϊόν που έχουν αγοράσει (Hailu & Belay, 2020), (Machado et al., 2020).

Σχετικά με τις μεθόδους που ακολουθούνται ώστε να κατηγοριοποιηθεί ένα μέλι σε μια από τις δύο προαναφερθείσες ομάδες, στηρίζονται στον προσδιορισμό μερικών φυσικοχημικών παραγόντων. Οι τεχνικές που ακολουθούνται είναι η ανάλυση των σακχάρων, των οργανικών οξέων και των αμινοξέων φρέσκων μελιών καθώς και ο προσδιορισμός της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της υγρασίας και της αγωγιμότητας του νερού (Yayinie et al., 2021). Αυτές, σε συνδυασμό με την μελισσοπαλυνολογική ανάλυση, βοηθούν όχι μόνο στον χαρακτηρισμό ενός μελιού ως μονοανθικό ή πολυανθικό, αλλά και στην εκτίμηση της ποιότητας του ως τρόφιμο. Αναλυτικότερα, η μελισσοπαλυνολογική ανάλυση στηρίζεται στη μικροσκοπική ανάλυση των ίζημάτων του μελιού, δηλαδή των γυρεόκοκκων, γνωστή και ως «γυρεοσκοπική ανάλυση» (Bentabol Manzanares et al., 2011b).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα μέλια κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την διατροφή της μέλισσας. Οι δύο μεγάλες κατηγορίες είναι το μέλι νέκταρος και το μέλι μελιτώματος. Συγκεκριμένα, ένα μέλι μελιτώματος είναι μείγμα από νέκταρ και μελιτώδεις εκκρίσεις, δηλαδή εκκρίσεις εντόμων που τρέφονται με τον χυμό των φυτών ή εκκρίσεις ζωντανών ιστών του ίδιου του φυτού.

Το μέλι μελιτώματος προέρχεται κυρίως από έλατα, πεύκα και φυλλοβόλα δέντρα όπως ιτιά, βελανιδιά και καστανιά (Simona et al., 2012). Ειδικότερα, ως μελίτωμα ορίζεται η πλεονάζουσα ουσία του χυμού του φυτού που έχει απομυζήσει η μέλισσα μέσω ειδικών στομάτων (μακρά, σωληνοειδή προβοσκίδα) που διαθέτει. Το μέλι μελιτώματος χαρακτηρίζεται ως μέλι υψηλότερης διατροφικής αξίας λόγω της επεξεργασίας στην οποία υπόκειται ο χυμός από τα ηπατικά ένζυμα του εντόμου. Επιπλέον, κατά την διέλευσή του από το σώμα της μέλισσας, ο χυμός εμπλουτίζεται με βιταμίνες και διάφορες άλλες ουσίες. Για αυτό, αν και οι μελέτες που αφορούν το συγκεκριμένο είδος μελιού είναι περιορισμένες σε σύγκριση με αυτές που έχουν διεξαχθεί για το μέλι νέκταρος, έχει αποδειχθεί ότι το μέλι μελιτώματος χαρακτηρίζεται από την αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση του (Ng et al., 2020).

Η ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός των μελιών από μελίτωμα από τα μέλια νέκταρος πραγματοποιούνται με την χρήση μεθόδων ταυτοποίησης φυσικοχημικών παραμέτρων και προσδιορισμού της ποιότητας που ορίζονται από τον κώδικα Codex Alimentarius (Bergamo et al., 2019).

Τα κριτήρια είναι ίδια με αυτά για τον διαχωρισμό των πολυανθικών και των μονοανθικών μελιών, όπως το ποσοστό υγρασίας, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των σακχάρων (Schievano et al., 2016), (Bergamo et al., 2019). Μάλιστα, το ποσοστό υγρασίας αποτελεί γενικότερα κριτήριο ποιότητας του μελιού καθώς υψηλή τιμή αυτής της παραμέτρου υποδεικνύει ότι το μέλι συλλέχθηκε νωρίτερα από την επιθυμητή χρονική στιγμή. Συνεπώς, δεν έχει ωριμάσει πλήρως και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κρυστάλλωση και απώλεια γεύση και οσμής (Yayinie et al., 2021).

Η αυθεντικοποίηση του μελιού χαρακτηρίζεται από ορισμένες δυσκολίες όσον αφορά την περιοχή και το φυτό από το οποίο έχει παραχθεί. Μια πηγή ταυτοποίησης

αποτελεί, σε συνδυασμό με τις παραπάνω μεθόδους, η γυρεοσκοπική ανάλυση. Ένα ακόμα κριτήριο αποτελεί ο ρυθμός F (fructose) / G (glucose) (Deibert et al., 2010), ο οποίος είναι χαμηλότερος στο μέλι ανθέων συγκριτικά με αυτό του μελιτώματος (Bergamo et al., 2019).

Σημειώνεται πως όσο πιο υψηλός είναι ο ρυθμός αυτός, τόσο χαμηλότερος είναι και ο γλυκαιμικός δείκτης (GI). Είναι γνωστό ότι τροφές με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη συμβάλλουν στην μείωση της ραγδαίας αύξησης των περιπτώσεων διαβήτη (Med Sci et al., n.d.), (Hills et al., 2019).

1.4 Οικονομικά στοιχεία

Λόγω της γλυκιάς του γεύσης αλλά και των ποικίλων θετικών επιδράσεων του στη υγεία, το μέλι έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις πιο περιζήτητες ουσίες (Cosmina et al., 2016). Η αυξημένη ζήτηση του, ωστόσο, δεν παρατηρείται μόνο στον τομέα της διατροφής. Με την πάροδο του χρόνου, οι επιστήμονες άρχισαν να χρησιμοποιούν το μέλι συνδυαστικά με φαρμακευτικές αγωγές λόγω των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του (Ahmad Bhat et al., n.d.).

Η δυσκολία στην παραγωγή του αποτελεί τον κύριο παράγοντα διαμόρφωσης της τιμής ενός μελιού. Συγκεκριμένα, οι καιρικές συνθήκες, το κλίμα και το έδαφος ανήκουν στους παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή ενός προϊόντος μελιού που εξάγει μια περιοχή, καθώς επηρεάζεται άμεσα η παραγωγικότητα μιας αποικίας μελισσών καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός του μελιού ως «θρεπτικό προϊόν», σε συνδυασμό με την προσπάθεια των περισσότερων να διατηρήσουν έναν υγιεινό τρόπο ζωής, έχει επηρεάσει την αγορά και κατανάλωση του (Ismaiel et al., 2014). Μάλιστα, οι γνώσεις που έχουν αποκτηθεί στις μέρες μας σχετικά με την συμπεριφορά των καταναλωτών αλλά και στον τομέα του μάρκετινγκ, έχουν τοποθετήσει το μέλι στην κατηγορία των «ακριβών» ειδών διατροφής (Moisescu, n.d.), (Ismaiel et al., 2014). Πλέον, ένα μεγάλο ποσοστό των καταναλωτών τείνει να διαθέτει περισσότερα χρήματα για ένα προϊόν το οποίο θα είναι βιολογικό, δεν θα διαθέτει επιρόσθετες χημικές ουσίες και θα έχει υποστεί την μικρότερη δυνατή επεξεργασία (Yeow et al., 2013).

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες έρευνες με σκοπό την καταγραφή των ποσοστών κατανάλωσης και παραγωγής μελιού ανά χώρα ή περιοχή. Για παράδειγμα, η ζήτηση του μελιού φαίνεται να είναι αυξημένη στην Σαουδική Αραβία, όχι μόνο για την υψηλή διατροφική αξία αλλά επειδή έχει συσχετιστεί και με την διεξαγωγή παραδοσιακών και θρησκευτικών περιστάσεων (Cosmina et al., 2016),(Ismaiel et al., 2014).

Επίσης, αναλύσεις της λιανικής αγοράς του μελιού στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν δείξει ότι οι καταναλωτές είναι πρόθυμοι να διαθέσουν έως και ένα μεγάλο ποσοστό των εσόδων τους σε μέλι, ειδικά αν αυτό είναι μονοανθικό και ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένες προτιμήσεις σε γεύση και οσμή (Cosmina et al., 2016), (Jensen & Mørkbak, 2013).

Εν κατακλείδι, η επίγνωση των ευεργετικών ιδιοτήτων του μελιού στην ανθρώπινη υγεία, η εμπιστοσύνη που δημιουργείται λόγω της αναφοράς του ως ένα από τα παλαιότερα «φυσικά φάρμακα», μαζί με την ικανότητα των εταιρειών να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένες απαιτήσεις των καταναλωτών, συνέβαλαν στην διαμόρφωση μια σχετικά υψηλής τιμής για το θρεπτικό αυτό προϊόν. Ωστόσο, η στροφή των καταναλωτών σε τρόφιμα με μικρή χημική επεξεργασία, όπως το μέλι, με σκοπό να επωφεληθούν από τα θρεπτικά συστατικά τους, σε συνδυασμό με την θέληση των παραγωγών να επεκταθούν στην αγορά, καθιστά αναγκαία την εκτίμηση των ιδιοτήτων των γεωργικών προϊόντων πρωτού αυτά κυκλοφορήσουν στην αγορά (Kyriazis et al., 2021a).

1.5 Σύσταση

Το μέλι αποτελεί φυσική τροφή η οποία συνίσταται κυρίως από σάκχαρα, γεγονός το οποίο του έχει αποδώσει τον χαρακτηρισμό του φυσικού γλυκαντικού. Είναι μείγμα με πάνω από 180 συστατικά εμπεριέχει εκτός των αμινοξέα, οργανικά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνες, ένζυμα καθώς και αρωματικές και μεταλλικές ουσίες (P. M. da Silva et al., 2016).

1.5.1 Σάκχαρα

Στην ουσία, το μέλι είναι ένα συμπυκνωμένο υδατικό διάλυμα φρουκτόζης και γλυκόζης. Γενικότερα, η φρουκτόζη αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό, σε ποσοστό περίπου 40% και ακολουθεί η γλυκόζη, σε ποσοστό 35% (Nguyen et al., 2019). Λίγα μόνο είδη μελιού έχουν, με μικρή διαφορά, περισσότερη γλυκόζη από ότι φρουκτόζη, όπως είναι για παράδειγμα το μέλι πικραλίδας “*Taraxacum officinale*” ή το μέλι ελαιοκράμβης «*Brassica napus*” (Escuredo et al., 2014). Τα σάκχαρα που απαντώνται στο μέλι σχηματίζονται κατά την ωρίμανση από την δράση ορισμένων ενζύμων που βρίσκονται στους σιελογόνους αδένες των μελισσών, όπως η ινβερτάση. Ωστόσο, το συγκεκριμένο ένζυμο διαθέτει και την ενεργότητα trans-γλυκοζυλάσης, με αποτέλεσμα να συνθέτει και δι- ή τρισακχαρίτες από τους μονοσακχαρίτες (Machado De-Melo et al., 2018). Έτσι, προκύπτει ένα μείγμα το οποίο περιέχει κατά προσέγγιση 70%-75% μονοσακχαρίτες και 10%-15% δισακχαρίτες οι οποίοι συνίσταται από φρουκτόζη και γλυκόζη, με τον γλυκοσιδικό δεσμό να βρίσκεται σε διαφορετικές θέσεις και διαμορφώσεις (Ouchemoukh et al., 2010). Οι κύριοι δισακχαρίτες στο μέλι είναι η σουκρόζη, η μαλτόζη και η τρεαλόζη, ενώ ένας από τους τρισακχαρίτες που έχουν βρεθεί σε μικρό ποσοστό είναι η μαλτοτριόζη (P. M. da Silva et al., 2016).

Τα σάκχαρα καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού όπως για παράδειγμα το ιξώδες και την ρεολογική συμπεριφορά μέσω της οποίας λαμβάνονται πληροφορίες για την δομή και την λειτουργικότητα του τροφίμου (Nguyen et al., 2019). Η συγκέντρωση της φρουκτόζης, της γλυκόζης και η μεταξύ τους σχέση, συνιστούν σημαντική παράμετρο στην ταξινόμηση των μονοανθικών μελιών (P. M. da Silva et al., 2016).

1.5.2 Οργανικά οξέα

Όλα τα είδη μελιού, παρά το γεγονός ότι είναι γλυκά, παρουσιάζουν χαμηλή οξύτητα λόγω της ύπαρξης οργανικών οξέων, η οποία, μάλιστα, συμβάλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η γεύση και η οσμή (Ahmad et al., 2017). Το είδος των οργανικών οξέων και το ποσοστό στο οποίο εμπεριέχονται δίνουν μια κατευθυντήρια γραμμή όσον αφορά την βοτανική και γεωγραφική προέλευση ενός μελιού (P. M. da Silva et al., 2016). Εφόσον, λοιπόν, ο προσδιορισμός τους στο μέλι

σχετίζεται με την αυθεντικοποίηση του, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης νοθείας (Valverde et al., 2022). Το γλυκονικό οξύ, το οποίο είναι προϊόν της οξειδωσης της γλυκόζης, αποτελεί το κυριότερο οργανικό οξύ που συναντάται στο μέλι, (Bonsignore et al., 2021), ενώ μερικά άλλα είναι το ασπαρτικό, το κιτρικό, το φουμαρικό το γαλακτουρονικό, το μαλονικό και το βουτυρικό (Cianciosi et al., 2018a). Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του γλυκονικού και του κιτρικού οξέος είναι μια αξιόπιστη παράμετρος διαφοροποίησης ενός μελιού ανθέων από ένα μέλι μελιτώματος.

1.5.3 Φαινολικές ενώσεις

Στο μέλι περιέχεται και ένα σύνολο φαινολικών ενώσεων, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή. Πρόκειται για βιολογικά ενεργούς, δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται στα φυτά και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής καθώς σε μοριακό επίπεδο μπορούν να δράσουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Nascimento et al., 2018). Οι φαινολικές ενώσεις όχι μόνο προσδίδουν στο μέλι, σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι τα υπόλοιπα συστατικά, τις ωφέλιμες και ευεργετικές του ιδιότητες, αλλά συμβάλουν και στην κατηγοριοποίηση των ειδών μελιού σύμφωνα με την βοτανική τους προέλευση (Nascimento et al., 2018).

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια σημαντική ομάδα των φαινολικών ενώσεων. Έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να διακριθούν σε δύο υποομάδες: υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα παρουσιάζουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με βάση την θέση των υδροξυλίων -OH στον αρωματικό δακτύλιο. Το κυριότερο είναι το γαλλικό οξύ ή αλλιώς 3,4,5 – τριυδροξυβενζοϊκό οξύ. Η δεύτερη υποομάδα είναι αρωματικές ενώσεις που διαθέτουν μία πλευρική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Διαθέτουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με την πρώτη υποομάδα λόγω της ακόρεστης αλυσίδας που είναι συνδεδεμένη στην καρβοξυλική ομάδα. Το κυριότερο οξύ αυτής της κατηγορίας είναι το καφεϊκό οξύ (Heleno et al., 2015).

Ωστόσο, στο μέλι, τα φλαβονοειδή αποτελούν τις κυριότερες ενώσεις με βιολογική λειτουργία. Είναι υδατοδιαλυτές ενώσεις, χαμηλού μοριακού βάρους και η συμβολή τους στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού ξεπερνάει οποιοδήποτε άλλο φυσικό συστατικό του (B. Silva et al., 2021). Διαθέτουν δύο

αρωματικούς δακτυλίους, A και B, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μια γέφυρα τριών ατόμων C, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο C (Nguyen et al., 2019). Ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες, όπως οι φλαβανόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβόνες, οι ανθοκυανίνες και οι ανθοξανθίνες (Masad et al., 2021). Μερικά φλαβονοειδή που απαντώνται στο μέλι είναι η μυρικετίνη, η καεμφερόλη, η γαλανγίνη και η κουερσετίνη (Nguyen et al., 2019), (P. M. da Silva et al., 2016).

1.5.4 Αμινοξέα

Το μέλι περιλαμβάνει αμινοξέα όπως η προλίνη, η λυσίνη, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη, το γλουταμινικό και το ασπαρτικό οξύ, τα οποία προέρχονται από την γύρη, το νέκταρ ή/και από τις ίδιες τις μέλισσες (Zaid et al., 2021). Ωστόσο, τα πιο κοινά αμινοξέα είναι η γλυκίνη, η βαλίνη, η σερίνη και η θρεονίνη (Sharoni et al., 2006), ενώ η προλίνη φαίνεται να είναι το κυρίαρχο αμινοξύ αποτελώντας το 50%-85% του συνολικού περιεχομένου του μελιού σε αμινοξέα (Ahmed et al., 2018a) και προέρχεται κυρίως από τις εκκρίσεις σιέλου των μελισσών κατά την μετατροπή του νέκταρος σε μέλι (P. M. da Silva et al., 2016)

Στις μέρες μας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν σημειώσει οι μελέτες που επικεντρώνονται στην ωρίμανση του μελιού, οι οποίες αναφέρονται στην προλίνη ως δείκτη της ωρίμανσης του, υποστηρίζοντας ότι μέλι στο οποίο το περιεχόμενο του συγκεκριμένου αμινοξέος είναι κάτω από 180 mg/kg θεωρείται ότι δεν έχει ωριμάσει ακόμη (Zhang et al., 2021). Η προλίνη ξεχωρίζει μεταξύ των αμινοξέων για αρκετούς λόγους. Ένας από αυτούς είναι η ικανότητα των μελισσών να διακρίνουν την γεύση της. Επιπλέον, αποτελεί πολύ σημαντικό αμινοξύ για τα έντομα από λειτουργική άποψη. Συγκεκριμένα, απαντάται στην αιμόλεμφο των εντόμων σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από κάθε άλλο αμινοξύ, και απαιτείται για την ωοτοκία της βασίλισσας όπως και στην ανάπτυξη των εντόμων γενικότερα, ειδικά κατά το στάδιο διαμόρφωσης των φτερών (Sharoni et al., 2006).

1.5.5 Μεταλλικά στοιχεία

Τα μεταλλικά στοιχεία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ποιοτική εκτίμηση του μελιού. Το περιεχόμενο των μεταλλικών στοιχείων ποικίλλει από 0,04% στα ανοιχτόχρωμα έως και στα 0,20% στα πιο σκουρόχρωμα. Τα κυριότερα έχουν ως βασική πηγή προέλευσης το έδαφος καθώς και τα φυτά από τα οποία παράγεται το νέктar (Solayman et al., 2016). Λόγω του ότι το φυτό προσλαμβάνει θρεπτικά συστατικά, ανάμεσα σε αυτά και μέταλλα, από το έδαφος μέσω των ριζών του, ένα γόνιμο έδαφος αποτελεί την βάση για υγιή φυτά και πλούσια καρποφορία (Weidenhamer & Callaway, n.d.). Συνεπώς, το νέκταρ των ανθέων ή οι εκκρίσεις του φυτού που θα επεξεργαστούν οι μέλισσες, θα είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία (Czipa et al., n.d.). Ωστόσο, τα μέταλλα είναι πιθανό να προέρχονται και από ανθρωπογενείς παράγοντες, όπως είναι για παράδειγμα η περιβαλλοντική ρύπανση. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η σύσταση του μελιού σχετίζεται με την βοτανική και γεωγραφική προέλευση, αποδεικνύουν ότι η περιεκτικότητα των μεταλλικών στοιχείων στο μέλι μπορεί να αποτελέσει βιολογικό δείκτη της περιβαλλοντικής μόλυνσης μια περιοχής (Smith et al., 2021).

Από τα μεταλλικά στοιχεία, κάποια θεωρούνται κύρια, όπως είναι το Ca, Na, K, Cl, Mg και απαντώνται στον άνθρωπο σε ποσότητα > 50 mg/d, ενώ κάποια άλλα είναι δευτερεύοντα και ονομάζονται ιχνοστοιχεία ή μικροστοιχεία, όπως είναι το Fe, Cu, Zn με αντίστοιχη ποσότητα < 50 mg/d (Zhu, n.d.). Τα ίχνο- ή μικροστοιχεία είναι ωφέλιμα για την υγεία, ειδικά αν έχουν οργανική ή φυτική προέλευση. Διαφορετικά, αν προέρχονται από μεταλλική πηγή, θεωρούνται ως βαρέα μέταλλα και είναι τοξικά (Ajibola et al., 2012). Το K είναι το κύριο μεταλλικό στοιχείο που συναντάται στο μέλι με ποσότητα 742,43 mg/kg (Solayman et al., 2016). Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα άλλα μεταλλικά στοιχεία είναι πιθανό να μην υπάρχουν ανάμεσα στα συστατικά ενός μελιού που έχει συλλεχθεί από μια συγκεκριμένη περιοχή, ενώ υπάρχουν σε είδη μελιού από διαφορετική περιοχή. Για παράδειγμα, τα στοιχεία Ni και Cr δεν απαντώνται σε μέλι που έχει παραχθεί από την Αίγυπτο, σε αντίθεση με αυτά της Τουρκίας ή της Νέας Ζηλανδίας (Vanhanen et al., 2011). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η σύσταση του εδάφους, ανά περιοχή και η βοτανική προέλευση σχετίζονται με το περιεχόμενο των μεταλλικών στοιχείων στο μέλι και κατ'επέκταση, με την σύσταση του γενικότερα.

1.5.6 Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι συμπλέγματα οργανικών ενώσεων τα οποία είναι απαραίτητα για τον οργανισμό καθώς ενισχύουν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη και ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία παρά το γεγονός ότι απαντώνται σε μικρές ποσότητες (Zawawi, Chong, Tom, et al., 2021). Ομοίως και στο μέλι, δεν περιέχονται σε μεγάλη ποσότητα, ωστόσο είναι σημαντικές για τον χαρακτηρισμό των ποιοτικών και θρεπτικών του ιδιοτήτων (Flanjak et al., 2016). Η πηγή προέλευσης των βιταμινών που εμπεριέχονται στο μέλι είναι το νέκταρ ή το μελίτωμα και η γύρη (Combarros-Fuertes et al., 2018). Επιπλέον, λόγω του υψηλού ποσοστού νερού στο μέλι, οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε υδατοδιαλυτές βιταμίνες (Zawawi, Chong, Nadhirah, et al., 2021).

Το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκουν στο σύμπλεγμα βιταμινών B, συμπεριλαμβανομένων και της θειαμίνης/B1, ριβοφλαβίνης/B2, νιασίνη/B3, παντοθενικό οξύ/B5, πυριδοξίνη/B6, βιοτίνη/B8 και φολικό οξύ/B9. Η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ, επίσης, απαντάται στο μέλι, ωστόσο είναι δύσκολος ο προσδιορισμός της ποσότητας της λόγω της αστάθειας της, η οποία οφείλεται στην χημική και ενζυμική οξειδωσή (αμαύρωση) της (Afrin, Haneefa, et al., 2019). Η αντίδραση αυτή επιταχύνεται με την μεταβολή ορισμένων παραγόντων όπως είναι για παράδειγμα το φως, το οξυγόνο ή η θερμότητα. Οι βιταμίνες αυτές διατηρούνται εξαιτίας της χαμηλής οξύτητας του μελιού (P. M. da Silva et al., 2016).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετές μελέτες για τις βιταμίνες στο μέλι, λίγες μόνο από αυτές αναλύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα τους και πως αυτή συσχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού (Zawawi, Chong, Tom, et al., 2021). Για παράδειγμα, η βιταμίνη C είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση, ωστόσο έχει βρεθεί ότι στην ποσότητα που περιέχεται στο μέλι, δεν συνεισφέρει σημαντικά στην αντιοξειδωτική του ικανότητα (Zawawi, Chong, Tom, et al., 2021), (Combarros-Fuertes et al., 2018).

1.5.7 Ένζυμα

Στην χημική σύσταση του μελιού συμπεριλαμβάνονται και ορισμένα ένζυμα, τα οποία προέρχονται σχεδόν στο σύνολό τους από τους αδένες των μελισσών (Seraglio et al., 2021). Συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά προστίθενται στο νέκταρ ή στο μελίτωμα

κατά την διάρκεια επεξεργασίας τους από τα έντομα, με σκοπό την μετατροπή τους σε μέλι (Machado De-Melo et al., 2018). Επιπλέον, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του τροποποιώντας μερικά από τα συστατικά του (Seraglio et al., 2021).

Τα επικρατέστερα είναι η ινβερτάση, η οξειδάση της γλυκόζης και η διαστάση. Παρόλα αυτά, και άλλα ένζυμα, όπως είναι η καταλάση και η όξινη φωσφατάση (ACP) μπορεί να εντοπιστούν ανάμεσα στα συστατικά ενός μελιού, όμως αυτό εξαρτάται από το είδος του (Makhloufi et al., 2020). Αναλυτικότερα, μετά την συλλογή του νέκταρ ή του μελιτώματος, προστίθεται από τις μέλισσες η ινβερτάση, η οποία υποβοηθά την υδρόλυση της σουκρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη (Tashkandi, 2021a). Η διαστάση περιγράφει μια ευρύτερη κατηγορία αμυλολιτικών ενζύμων, η οποία συμπεριλαμβάνει τις α- και β-αμυλάση. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την διάσπαση της αμυλόζης σε γλυκόζη, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο στο μέλι την χαρακτηριστική γλυκιά γεύση του (Seraglio et al., 2019).

Όσο αφορά την οξειδάση της γλυκόζης, διασπά την γλυκόζη και συγκεκριμένα την μετατρέπει σε γλυκονολακτόνη, η οποία υδρολύεται σε γλυκονικό οξύ. Εκτός από δ-γλυκονολακτόνη, η γλυκόζη παράγει και υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο είναι απαραίτητο αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί επιβλαβές προϊόν για το κύτταρο (Ahmed et al., 2018b) και αποικοδομείται από την καταλάση. Με αυτόν τον τρόπο, η οξειδάση της γλυκόζης ρυθμίζει την οξύτητα του μελιού (Makhloufi et al., 2020; Tashkandi, 2021a).

1.6 Χρήσεις

1.6.1 Γενικά:

Το μέλι αποτελεί μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ουσίες στην ιστορία του ανθρώπου. Οι χρήσεις του μελιού είναι γνωστές από τα αρχαία κίονα χρόνια, ενώ οι ευεργετικές του ιδιότητες του βρίσκουν εφαρμογή μέχρι και σήμερα σε πολλούς τομείς (Hussain, 2018).

Μια από τις πρώτες χρήσεις του αφορούν την αξιοποίηση στη διατροφή ως φυσικό γλυκαντικό. Με αυτόν τον τρόπο, προσδίδεται στα γεύματα, αλλά και σε

οποιοδήποτε βρώσιμο εμπόρευμα, μια χαρακτηριστική, γλυκιά γεύση. Μάλιστα, υπάρχουν αναφορές για ένα είδος αρωματικής “καραμέλας” που παρήγαγαν οι Αιγύπτιοι, με πρώτη ύλη το μέλι, η οποία προσέφερε φρεσκάδα και ευχάριστη γεύση. Αντίστοιχα στην Ρώμη, είχαν παρασκευάσει μια πάστα, λεγόμενη και ως “honey-mint” (Burlando & Cornara, 2013).

Μια ακόμα ευρεία χρήση του μελιού σχετίζεται με τον τομέα της αισθητικής. Η συγκεκριμένη βιομηχανία αναμειγνύει το μέλι με διάφορα άλλα συστατικά προκειμένου να δημιουργήσει προϊόντα που στοχεύουν στην φροντίδα και την περιποίηση τόσο του δέρματος όσο και των μαλλιών (Ediriweera & Premarathna, 2012).

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την χημική σύσταση του, το μέλι «προμηθεύει» τον ανθρώπινο οργανισμό με ιχνοστοιχεία, μέταλλα και βιταμίνες. Για αυτό αποτελεί και προϊόν το οποίο χρησιμοποιείται στον τομέα της υγείας.

1.6.2 Μέλι και Υγεία

i) Διαβήτης:

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό προϊόν, το οποίο σε σύγκριση με την ζάχαρη, έχει χαμηλότερο γλυκαιμικό δείκτη (Eteraf-Oskouei & Najafi, n.d.-a). Παρόλο που ο μηχανισμός της υπογλυκαιμικής δράσης του δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Terzo et al., 2020), έχει προταθεί ως τροφή που βοηθάει στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Αυτό μπορεί να βασίζεται στην χαμηλή απορρόφηση των σακχάρων που εμπεριέχονται στην συγκεκριμένη ουσία από τον εντερικό αυλό του ανθρώπου, με συνέπεια να μην αυξάνονται τόσο γρήγορα τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα (Khan et al., n.d.).

Ακόμη, μελέτες που καταδεικνύουν την υπογλυκαιμική επίδραση του μελιού, το συσχετίζουν με την διέγερση της έκκριση ινσουλίνης, την βελτίωση του προφίλ των λιπιδίων καθώς και την μείωση των τριγλυκεριδίων σε ασθενείς με υπερτριγλυκεριδαιμία (Eteraf-Oskouei & Najafi, n.d.-a).

Επίσης, σημαντικό ρόλο στην προκειμένη περίπτωση διαδραματίζει και το

γεγονός ότι το μέλι, σε κατάλληλες δόσεις, μειώνει τα επίπεδα της προσταγλαδίνης, η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες αναστολής της ινσουλίνης (Farakla et al., 2019).

ii) Παχυσαρκία:

Η παχυσαρκία είναι ένα μεταβολικό σύνδρομο που σχετίζεται με την παθολογική διόγκωση του λιπώδους ιστού. Αυτή η κατάσταση οδηγεί στην αυξημένη έκκριση λιπαροκυτταροκινών, η οποία συμβάλλει σε χρόνια φλεγμονή (Mehta et al., n.d.). Μελέτες έχουν δείξει την άμεση συσχέτιση της παχυσαρκίας με το οξειδωτικό στρες. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι το μέλι διαθέτει αντιοξειδωτική δράση, δίνει την δυνατότητα της χρήσης του ως βάση για την παραγωγή φαρμάκων με σκοπό την διαχείριση της ασθένειας (Terzo et al., 2020).

Επιπλέον, η παχυσαρκία σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Συνδυάζοντας τα δεδομένα που έχουν καταγραφεί για το μέλι και την αύξηση στην έκκριση ινσουλίνης καθώς και την μείωση των επιπέδων των προσταγλαδινών, μπορεί να γίνει κατανοητή η χρησιμότητα του μελιού στην εφαρμογή πιθανών φαρμακολογικών θεραπειών του συγκεκριμένου μεταβολικού συνδρόμου (Farakla et al., 2019).

iii) Καρδιαγγειακές παθήσεις:

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως η ισχαιμική καρδιοπάθεια, η αρρυθμίες και η μυοκαρδίτιδα αποτελούν συχνή αιτία θανάτου και η θεραπεία τους συνοδεύεται από μεγάλο κόστος (Mehta et al., n.d.). Οι ουσίες που εμπεριέχονται στο μέλι, και συγκεκριμένα τα φλαβονοειδή, η βιταμίνη C και οι πολυφαινόλες, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης φαίνεται να μειώνουν το ρίσκο ως προς τις παθήσεις αυτές (Εικόνα 1) (Eteraf-Oskouei & Najafi, n.d.-b).

Πιο αναλυτικά, τα φλαβονοειδη, μέσω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, προστατεύουν την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Olas, n.d.) και κατα συνέπεια εμποδίζουν την εμφάνιση της καρδιακής μυϊκής νόσου ή αλλιώς μυοκαρδίτιδας (Eteraf-Oskouei & Najafi, n.d.-b). Μάλιστα, η καεμφερόλη, κουερσετίνη

(Terzo et al., 2020), η γαλανγίνη και το καφεϊκό οξύ, είναι φαινόλες οι οποίες έχουν υποσχόμενο ρόλο στην αντιμετώπιση αυτής της κατηγορίας ασθενειών.

Ειδικότερα, η κουερσετίνη περιορίζει τα συμπτώματα της υπέρτασης και της αγγειακής δυσλειτουργίας, ενώ η γαλανγίνη, κατέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες στον ενδοθηλιακό ιστό και εμποδίζει την λιπιδική υπεροξείδωση και κατα συνέπεια τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Khan et al., n.d.).

Phenolic Compounds	
Flavonoids	Phenolic Acids
Eucalyptus Honey	
Chrysin (C ₁₅ H ₁₀ O ₄)	Benzoic acid (C ₇ H ₆ O ₂)
Isorhamnetin (C ₁₆ H ₁₂ O ₇)	Caffeic acid (C ₉ H ₈ O ₄)
Kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Chlorogenic acid (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)
Luteolin (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ellagic acid (C ₁₄ H ₆ O ₈)
Myricetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₈)	Ferulic acid (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)
Pinobanksin (C ₁₅ H ₁₂ O ₅)	Gallic acid (C ₇ H ₆ O ₅)
Pinocembrin (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)	p-coumaric acid (C ₉ H ₈ O ₃)
Tricetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	Protocatechuic acid (C ₇ H ₆ O ₄)
Quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	Syringic acid (C ₉ H ₁₀ O ₅)

Εικόνα 1: Οι πιο γνωστές φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα) στα διάφορα είδη μελιού (Olas, 2020).

iv) Αντισηπτική-Αντιμικροβιακή ιδιότητα και Επούλωση δερματικών πληγών:

Μια απο τις πιο κοινές θεραπευτικές εφαρμογές του μελιού αποτελεί η τοπική θεραπεία δερματικών πληγών, όπως είναι για παράδειγμα τα εγκαύματα ή το στοματικό έλκος. Η ιαματική του ιδιότητα βασίζεται κυρίως στην αντισηπτική του δράση, η οποία είναι άμεσα συσχετιζόμενη με την χημική του σύσταση (Combarros-Fuertes et al., n.d.). Το φαινολικό περιεχόμενο, το pH, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ωσμωτική πίεση είναι παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του ικανότητα (Mohd Nasir et al., 2010).

Συγκεκριμένα, μέσω ώσμωσης δημιουργείται ένα φραγμός προστασίας καθώς και οι κατάλληλες συνθήκες υγρασίας που προάγουν την επούλωση μιας πληγής.

Επιπλέον, διαλύματα με υψηλή ωσμωτικότητα, όπως είναι το μέλι, αναστέλουν την μικροβιακή ανάπτυξη. Αυτό συμβαίνει διότι τα μόρια των σακχάρων σχηματίζουν σύμπλοκα με τα μόρια του νερού και έτσι δεν υπάρχει η απαραίτητη διαθεσιμότητα νερού για να αναπτυχθούν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί. Όσον αφορά το υπεροξειδίο του υδρογόνου, έχει αποδειχθεί ότι σε συνδυασμό με το ασκορβικό οξύ, επάγει έναν αντιμικροβιακό μηχανισμό έναντι των αρνητικών Gram βακτηρίων (Al-Waili et al., 2011).

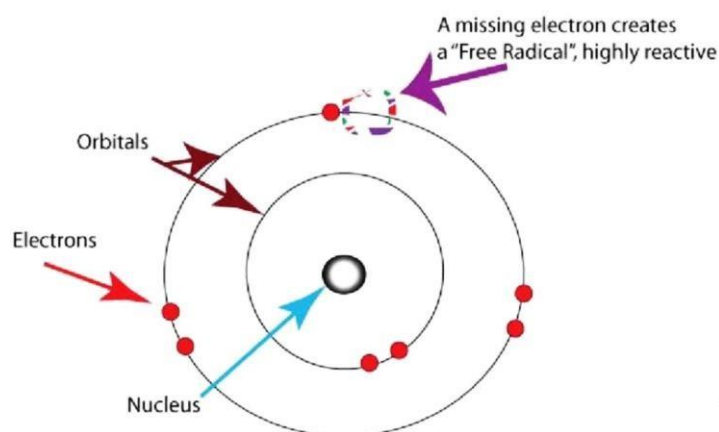
Το ερώτημα, βέβαια, είναι τί ποσότητα μελιού απαιτείται για να προκληθεί η επούλωση μιας δερματικής πληγής. Μελέτες έχουν δείξει ότι δεν έχουν όλα τα είδη μελιού την ίδια αποτελεσματικότητα. Διαφορετικά είδη, από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα. Αυτό ίσως οφείλεται στην διαφορετική βοτανική προέλευση, άρα και στην διαφορετική χημική σύσταση (Mohd Nasir et al., 2010).

1.7 Ελεύθερες ρίζες

Ο όρος “ρίζα” προτάθηκε, αρχικά, από τον Guyton de Morveau το 1786 και χρησιμοποιήθηκε αργότερα από τον Gay-Lussac, τον Liebig και τον Berzelius με σκοπό την περιγραφή ατόμων που δεν υφίστανται μεταβολή κατά την διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης. Παρά το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως προς τις ρίζες, το να απομονωθούν θεωρούνταν αδύνατον. Ωστόσο, το 1840, ο Berzelius σκέφτηκε ότι η αδυναμία απομόνωσης των ριζών οφείλεται στο γεγονός ότι σχηματίζουν σύμπλοκα. Οι ελεύθερες ρίζες έγιναν γνωστές μερικές δεκαετίες αργότερα, όπου οι Haber και Wilstätter πρότειναν την ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) (Meo & Venditti, 2020).

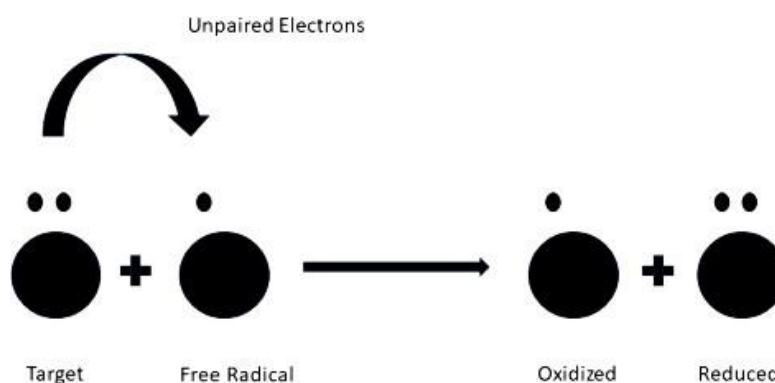
Σήμερα, ο όρος “ελεύθερη ρίζα” χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός ατόμου ή μορίου το οποίο χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αυτόνομης ύπαρξης αλλά και από το γεγονός ότι διαθέτει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα (Εικόνα 2). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι κατέχουν σημαντική θέση σε πολλές βιοχημικές διεργασίες καθώς αποτελούν μοριακά σήματα για αρκετά μεταβολικά μονοπάτια, όπως αυτά που σχετίζονται με την απόκκριση των κυττάρων

στο στρες (Sharma et al., 2018).



Εικόνα 2: Δομή ελεύθερης ρίζας

Πρόκειται για ασταθή μόρια, τα οποία ενώ έχουν σύντομο χρόνο ημιζωής, χαρακτηρίζονται από μεγάλη δραστηριότητα εξαιτίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων που διαθέτουν στην εξωτερική τους στιβάδα. Συγκεκριμένα, τα ίδια τα μόρια τείνουν να εξουδετερώνουν το φορτίο τους, αντιδρώντας με μία δεύτερη χημική ουσία, την οποία εν τέλει οξειδώνουν, δημιουργώντας έτσι μια νέα ελεύθερη ρίζα (Εικόνα 3) (Saqib Ali et al., 2020).



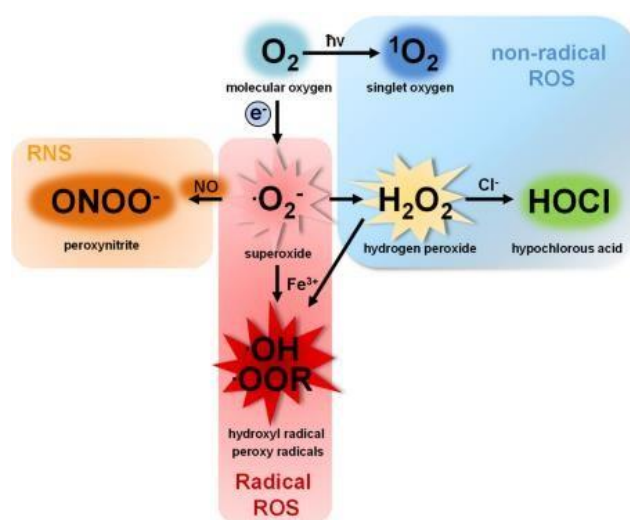
Εικόνα 3: Αντίδραση μεταξύ ελεύθερης ρίζας και ενός μορίου στόχου (Sharma et al., 2018).

1.8 Κατηγορίες δραστικών μορφών:

Ο όρος δραστικές μορφές χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ευρύτερη κατηγορία ανόργανων και οργανικών μορίων με διαφορετικές ιδιότητες, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το κεντρικό τους άτομο. Η μια από αυτές τις

κατηγορίες, οι δραστικές μορφές οξυγόνου [ROS, (Reactive Oxygen Species)], έχουν βασικό άτομο το οξυγόνο και διαθέτουν την ικανότητα να αντιδρούν με άλλα μόρια σχηματίζοντας τα υπόλοιπα είδη δραστικών μορφών (Εικόνα 4) (Sharapov et al., 2021), για αυτόν τον λόγο θεωρείται και ως η σημαντικότερη. Σε αυτήν συμπεριλαμβάνεται η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), τη ρίζα περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$), το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^- \cdot$) και δραστικές μορφές που δεν αποτελούν ρίζες όπως το όζον (O_3), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η μονήρης ρίζα οξυγόνου ($^1\text{O}_2$) (Poprac et al., 2017a). Ειδικότερα, η αντίδραση των ROS με άτομα αλογόνου οδηγεί στον σχηματισμό υποαλογονιτών όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Η συγκεκριμένη υποομάδα χαρακτηρίζεται ως δραστική μορφή οξυγόνου καθώς το κεντρικό άτομο των μοριών αυτών είναι το οξυγόνο και όχι το αλογόνο.

Σχετικά με τις άλλες κατηγορίες, μέσω αντίδρασης των ROS με το άζωτο σχηματίζονται οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), όπως είναι το μονοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$), το διοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$) και το περοξυνιτρικό (ONOO^-), ενώ η αλληλεπίδραση τους με χλώριο ή θείο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενεργών μορφών χλωρίου (RCS) και θείου (RSS) αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχουν και οι δραστικές μορφές πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Sharapov et al., 2021). Τέλος, τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης αποτελούν, επίσης, δραστικές μορφές, με πιο γνωστά τα λιπιδικά υπεροξείδια (LCOOHs) (Vladimirov & Proskurnina, 2009).



Εικόνα 4. Σχηματισμός ελευθέρων ριζών/δραστικές μορφών οξυγόνου (Herb et al., 2021).

1.9 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.9.1 Ενδογενείς πηγές

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται κυρίως ενδοκυτταρικά μέσω διαφόρων μηχανισμών. Οι βασικές πηγές αποτελούν ορισμένα ένζυμα που βρίσκονται στις μεμβράνες των κυττάρων, τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδιοσώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, το κυτόχρωμα p450 καθώς και η απόκριση σε φλεγμονή (Εικόνα 5) (Konno et al., 2021).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά την διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, μια διαδικασία η οποία διεξάγεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Pomatto & Davies, 2018). Περίπου το 90% των ROS των κυττάρων των θηλαστικών σχηματίζεται στα μιτοχόνδρια εξαιτίας της διαρροής των ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα κατά την παραγωγή ATP. Πιο αναλυτικά, η μεταφορά ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας, μέσω ορισμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα σύμπλοκα αυτά είναι διατεταγμένα με αυστηρό τρόπο στην μιτοχονδριακή μεμβράνη ώστε να εξυπηρετείται το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Όταν πραγματοποιείται διαρροή ηλεκτρονίων κατά την μεταφορά αυτή, τότε σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα (Adam-Vizi 2005, n.d.). Έχει αποδειχθεί ότι τα σύμπλοκα I και III, Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q και η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος αντίστοιχα, ευθύνονται σε μεγαλύτερο βαθμό για την παραγωγή ROS σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Fuhrmann & Brüne, 2017). Μετά από υπολογισμούς, το 0,2% του οξυγόνου που καταναλώνεται μετατρέπεται σε ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2 \bullet^-$), ενώ το 0,4% μετατρέπεται σε υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο ρυθμός μεταξύ $O_2 \bullet^-$ και H_2O_2 ($O_2 \bullet^- : H_2O_2 = 1:2$) παραμένει αμετάβλητος, υπό φυσιολογικές συνθήκες, και δεν εξαρτάται από την συγκέντρωση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου ή τον ρυθμό μιτοχονδριακής αναπνοής (Sharapov et al., 2021).

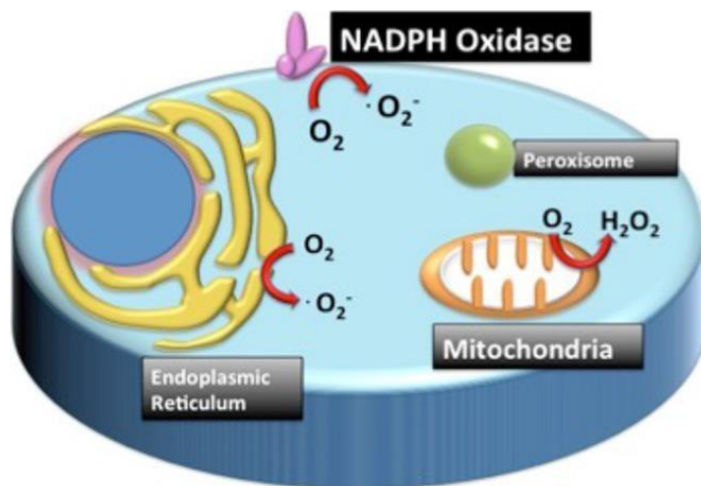
Το κυτόχρωμα p450, επίσης αποτελεί πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και ειδικότερα των H_2O_2 και $O_2 \bullet^-$. Πρόκειται για μια υπεροικογένεια ενζύμων, τις μονοοξυγενάσες, οι οποίες εμπλέκονται στον οξειδωτικό μεταβολισμό διαφόρων ουσιών, όπως είναι τα ξеноβιοτικά. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου

σχηματίζονται όταν κάποιο από τα ένζυμα του συγκεκριμένου καταλυτικού κύκλου δυσλειτουργεί ή απενεργοποιείται (Veith & Moorthy, 2018).

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο διεξάγεται ένας μεγάλος αριθμός διεργασιών όπως είναι η σύνθεση και η αναδίπλωση πρωτεϊνών καθώς και η εξουδετέρωση τοξικών ουσιών. Συγκεκριμένα, στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω μιας αλυσίδας αποτελούμενη από δύο συστήματα, τα οποία εστιάζουν στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών και στην σύνθεση λιπαρών οξέων. Κατά την διάρκεια αυτών των διαδικασιών μπορεί να προκύψει σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (di Meo et al., 2016).

Τα υπεροξειδιοσώματα αποτελούν μικρά οργανίδια τα οποία απαντώνται στους περισσότερους ευκαρυώτες. Στο εσωτερικό τους διεξάγονται πολλές αντιδράσεις οξείδωσης, όπως είναι για παράδειγμα η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση των χοληστερολών, καθώς και ο μεταβολισμός των αμινοξέων και των πουρινών. Τα ένζυμα που απαντώνται στα συγκεκριμένα οργανίδια και ευθύνονται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι η οξειδάση της ξανθίνης (xanthine oxidase, XO), η οξειδάση D-αμινοξέων (D-amino acid oxidase), η ουρική οξειδάση (urate oxidase, UO) και η οξειδάση του ακέτυλο-συνενζύμου A (acyl-coenzyme A oxidase, ACOX) (Konno et al., 2021).

Τέλος, μεταξύ των ενδογενών πηγών παραγωγής ελεύθερων ριζών είναι και τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινοφιλα και τα μακροφάγα. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω της αλληλεπίδρασης ορισμένων προφλεγμονωδών παραγόντων ή βακτηριακών προϊόντων με ειδικούς υποδοχείς, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου NADPH οξειδάσης (NADPH oxidase, NOX), η οποία είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Forrester2018, n.d.).



Εικόνα 5: Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών (Abid & Sellke, 2016).

1.9.2 Εξωγενείς πηγές

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν και από εξωγενείς παράγοντες. Ανάμεσα σε αυτούς είναι και η ιονίζουσα ακτινοβολία, η οποία κατέχει και τον μεγαλύτερο ρόλο. Τα ιονίζοντα σωματίδια μεταφέρουν ενέργεια στο νερό, ιονίζουν τα μόρια του και στην συνέχεια σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες μέσω διάστασης.

Επιπλέον, οι εισπνεόμενοι ατμοσφαιρικοί και χημικοί ρύποι, όπως είναι τα καυσαέρια και τα φυτοφάρμακα αντίστοιχα, περιλαμβάνουν μια πληθώρα δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου, με κυριότερες το όζον (O_3) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ομοίως, το κάπνισμα, παθητικό ή ενεργητικό, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και το στρες, επιβαρύνουν τον οργανισμό όσο αφορά την πρόσληψη ή παραγωγή ελευθέρων ριζών (Sharma et al., 2018).

1.10 Βιολογικές δράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σε μικρή, όταν απαντώνται στο κύτταρο σε χαμηλά επίπεδα, ρυθμίζουν την δράση μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, ενώ σε υψηλά επίπεδα προκαλούν σοβαρές

βλάβες σε οργανίδια του κυττάρου και μακρομόρια συμπεριλαμβανομένου και του DNA, του RNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσουν κυτταρικό θάνατο (Kaminsky & Zhivotovsky, 2014).

1.10.1 Αρνητικές επιδράσεις

i) Νουκλεϊκά οξέα

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με οποιαδήποτε, σχεδόν, κυτταρική δομή ή μόριο. Σχετικά με την αντίδραση τους με τα νουκλεϊκά οξέα, είναι ικανές να οξειδώσουν τις αζωτούχες βάσεις και κατα συνέπεια να προκαλέσουν χημική μετατροπή των πουρινών και των πυριμιδινών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην διάσπαση της έλικας (Roy et al., 2017). Όσο αφορά το DNA, ενώ η ρίζα υδροξυλίου (OH) μπορεί και παράγει προϊόντα μέσω αντίδρασης με όλες τις βάσεις, το μονήρες οξυγόνο προσβάλλει κυρίως την γουανίνη μέσω 8-υδροξυλίωσης. Έτσι, σχηματίζεται η 8-υδροξυγουανοσίνη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι τροποποιεί το πρότυπο μεθυλίωσης των παρακείμενων κυτοκινών (Sharma et al., 2018). Τέλος, η οξείδωση των αζωτούχων βάσεων του RNA, όταν αυτό εμπλέκεται στην σύνθεση πρωτεϊνών, είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε ορισμένες ασθένειες, όπως ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές ανεπάρκειες (Poulsen et al., 2012).

ii) Λιπίδια

Μεταξύ των στόχων των ελεύθερων ριζών είναι και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Μάλιστα, αποτελούν έναν από τους κυριότερους στόχους και χαρακτηρίζονται από την ευαισθησία τους όσον αφορά τις αντιδράσεις οξείδωσης, λόγω του διπλού δεσμού στην δομή των μορίων τους. Όταν τα λιπαρά οξέα αντιδρούν με δραστικές μορφές οξυγόνου, το προϊόν που παράγεται έχει την τάση να αφαιρεί ένα H⁺ από το λιπαρό οξύ (Roy et al., 2017). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται λιπιδική υπεροξείδωση, είναι ταχεία, ασταθής και ικανή να επάγει μια νέα σειρά αντιδράσεων. Με αυτόν τον τρόπο, η λιπιδική υπεροξείδωση μπορεί να αποτελέσει σήμα για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η κυτταρική απόπτωση (L.-J. Su et al., 2019).

iii) Πρωτεΐνες

Τέλος, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην οξείδωση των πρωτεϊνών μέσω προσβολής τους από δραστικές μορφές οξυγόνου ή αζώτου. Οι συγκεκριμένες μελέτες διεξήχθησαν υπό την έκθεση ιονίζουσας ακτινοβολίας με χρήση ενός μίγματος ρίζας υδροξυλίου και σουπεροξειδίου προκειμένου να διαλευκανθεί ο μηχανισμός αυτής της οξείδωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσβολή μιας πρωτεΐνης από την ρίζα υδροξυλίου έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση ενός μορίου H^+ από τον σκελετό της και κατά συνέπεια την δημιουργία ρίζας με κεντρικό άτομο τον άνθρακα (Valko et al., 2006). Οξείδωση, ωστόσο μπορεί να προκληθεί και στα αμινοξέα μιας πλευρικής αλυσίδας επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτής και της γειτονικής της (Neha et al., 2019). Ένα παράδειγμα είναι η προσβολή των θειολών (-SH) των αμινοξέων κυστεΐνης, η οποία καταλήγει σε δημιουργία δισουλφιδίων (Spasojević, 2011). Τα είδη των πρωτεϊνικών παραγόνων που δημιουργούνται με την οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να σχηματίσουν στραυροειδείς δεσμούς στο εσωτερικό τους, να αποικοδομηθούν από πρωτεάσες ή να σχηματίσουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Shararou et al., 2021). Σε οποιαδήποτε περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι επιβλαβές καθώς η φυσιολογική πρωτεΐνη είτε χάνει την λειτουργικότητα της, είτε κατακερματίζεται ολικώς.

1.10.2 Θετικές επιδράσεις

Το 1954, οι Common et al. (Roy et al., 2017) χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ESR ή EPR) για να παράξουν για πρώτη φορά δεδομένα σχετικά με την ύπαρξη των ελεύθερων ριζών σε σκελετικού μύες. Ήταν η πρώτη φορά που έγινε γνωστή η παρουσία των ελεύθερων ριζών σε βιολογικά συστήματα. Στην συνέχεια, αναγνωρίστηκε η Θεωρία Ελεύθερων ριζών και της Γήρανσης. Μέχρι τότε υποστηριζόταν από την επιστημονική κοινότητα, ότι η δράση αυτών των μορίων είναι αποκλειστικά επιβλαβής για το κύτταρο. Ωστόσο, το 1969, οι Mccord και Fridovich ανακάλυψαν την ύπαρξη ενός ενζύμου, της υπεροξειδικής δισμουτάσης, η οποία ανακάλυψη έπεισε τους επιστήμονες ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες για τα βιολογικά συστήματα (Roy et al., 2017).

Απο την σύγχρονη βιβλιογραφία, είναι γνωστό πως οι δραστικές μορφές

οξυγόνου (ROS), ως προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού, επάγουν μια πληθώρα ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. (Karmakar et al., n.d.).

Η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου εξυπηρετεί ως μοριακό σήμα για την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων. Με αυτόν τον τρόπο, επάγεται η άμυνα του οργανισμού ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες (di Meo & Venditti, 2020).

Επιπλέον, τα επίπεδα τους αυξάνονται κατά την διάρκεια μόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η αύξηση αυτή παίζει ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, πυροδοτεί την ανοσολογική απόκριση (Spooner & Yilmaz, 2011) μέσω της απόπτωσης των ουδετερόφιλων, η οποία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού σε περιπτώσεις προσβολής από μικρόβια (Rosales, n.d.).

Συμπληρώνοντας, η παραγωγή των ROS λαμβάνει χώρα και με την πρόσδεση ορισμένων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως είναι ο EGF και ο VEGF, σε διάφορες κλάσεις υποδοχέων. Σε αυτήν την περίπτωση, γίνεται λόγος για μικρές συγκεντρώσεις, όπου οι δραστικές μορφές οξυγόνου λειτουργούν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι σε σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Valko et al., 2006).

1.11 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν μόρια τα οποία έχουν την ικανότητα να ανάγουν τις ελεύθερες ρίζες και κατα συνέπεια να εξουδετερώνουν το φορτίο τους, μετατρέποντας τες από δραστικά μόρια σε ουδέτερα (Yang et al., 2018). Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να περιγράψει είτε αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, είτε ενώσεις που δεν αποτελούν ένζυμα αλλά έχουν αντιοξειδωτική δράση (Venza et al., 2021). Η σταθεροποίηση των ελεύθερων ριζών πραγματοποιείται χάρη στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δρουν είτε ως δέκτες, είτε ως δότες ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τα πρώτα να μην διαθέτουν πλέον ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική

τους στιβάδα (Sharapov et al., 2021). Τέλος, έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών, τόσο φυσικών όσο και συνθετικών. Απο τα φυσικά, κάποια μπορούν να παραχθούν ενδογενώς ως προϊόντα φυσιολογικού μεταβολισμού, ενώ άλλα αποτελούν συστατικά ορισμένων τροφών και εισάγονται στον οργανισμό μέσω διατροφής. Όσο αφορά τα συνθετικά, πρόκειται για μια κατηγορία ισχυρών αντιοξειδωτικών τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για να αποφευχθεί η αλλοίωση των τροφών. Διατηρούν την γεύση και την οσμή, ωστόσο οι επιδράσεις τους στα ανθρώπινα ενζυμικά συστήματα και στο DNA είναι αμφιλεγόμενες (Neha et al., 2019).

1.11.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα:

i) Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD):

Ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) διότι το μεγαλύτερο ποσοστό των δραστικών μορφών οξυγόνου σχηματίζονται από το ανιόν σουπεροξειδίου και αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στις ROS (L. J. Su et al., 2019). Οι περισσότεροι οργανισμοί που ζουν υπό αερόβιες συνθήκες έχουν τουλάχιστον μία ισομορφή SOD. Ωστόσο υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές οι οποίες διαφέρουν ως προς το μεταλλικό ιόν που απαιτούν για την λειτουργία τους (Wang et al., 2018) :

α) Η ισομορφή Cu/Zn SOD φέρει στο καταλυτικό της κέντρο ιόν χαλκού ή ψευδαργύρου

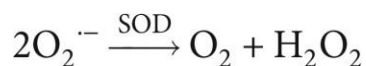
β) Η ισομορφή Mn SOD/Fe SODs φέρει στο καταλυτικό της κέντρο ιόν μαγγανίου ή σιδήρου

γ) Η ισομορφή φέρει στο καταλυτικό της κέντρο νικέλιο

Εκτός από την απαίτηση τους σε μεταλλικά ιόντα, οι υπεροξειδικές δισμουτάσες έχουν και διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό. Οι ευκαρυώτες εκφράζουν την ισομορφή Cu/Zn SOD στο κυτοσόλιο, ενώ την Mn SOD στα μιτοχόνδρια (Miller, 2012).

Συγκεκριμένα, η SOD καταλύει την αντίδραση του σουπεροξειδίου με τον εαυτό του

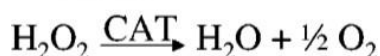
προς σχηματισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και νερού (di Meo & Venditti, 2020).



ii) Καταλάση (CAT):

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα κύτταρα του ανθρώπου, των φυτών, των ζώων και των αερόβιων βακτηρίων. Στα ζώα, οι μεγαλύτερες ποσότητες του ενζύμου έχουν σημειωθεί στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ στα φυτά στα υπεροξειδισώματα και σε μικρότερες ποσότητες στα μιτοχόνδρια (Sharma et al., 2018). Η καταλάση ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέποντάς το σε νερό και οξυγόνο ωστόσο απαιτεί μεταλλικά ιόντα ως συμπράγοντα ώστε να καταλύσει την συγκεκριμένη αντίδραση (Glorieux & Calderon, 2017).

Catalase:



iii) Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx):

Η GPx είναι μια σεληνοπρωτεΐνη που απαρτίζεται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες και αποτελεί την δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των ROS (Saqib Ali et al., 2020). Ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως συμπράγοντα και κατά την αναγωγή αυτή, η GSH οξειδώνεται σε GSSG (X. Li et al., 2013)

iv) Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR):

Η GR έχει αντίθετη δράση από την GPx και είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της GSSG διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τα φυσιολογικά επίπεδα μεταξύ της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο κύτταρο (X. Li et al., 2013). Ως υπόστρωμα για την συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται το NADPH (Yang et al.,

2018).

Glutathione Peroxidase Cycle:



1.11.2 Μη-ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί:

i) Βιταμίνη E:

Η βιταμίνη E είναι ένας συλλογικός όρος που περιγράφει μια ομάδα τεσσάρων τοκοφερολών (α-, β-, γ-, δ-) και τεσσάρων τοκοτριενολών (α-, β-, γ-, δ-). Πρόκειται για λιποδιαλυτές πρωτεΐνες με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο ενεργή ισομορφή στον άνθρωπο (Vitamin E: Regulatory Redox Interactions). Ειδικότερα, ανάγει τις ρίζες περοξυλίου εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την περαιτέρω οξείδωση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης (The Role of Vitamin E in Immunity). Δρα συνεργατικά με το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) με σκοπό την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης από ρίζες α-τοκοφερόλης που σχηματίζονται κατά την αναγωγή των ριζών περοξυλίου (Valko et al., 2006).

ii) Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ):

Η βιταμίνη C, γνωστή και ως ασκορβικό οξύ, αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως αναγνωρισμένα αντιοξειδωτικά. Μπορεί να δράσει είτε απευθείας στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) ανάγωντάς τες, είτε να μειώσει τον σχηματισμό τους αναστέλλοντας την ενεργότητα μιας συγκεκριμένης υπομονάδας της οξειδάσης του NADPH (Y. R. Li & Zhu, 2021). Επιπλέον, όχι μόνο αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες αλλά ταυτόχρονα συμβάλει και στην αναγέννηση άλλων ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων (Kyriazis et al., 2021b). Ωστόσο, ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει την βιταμίνη C, για αυτό και προσλαμβάνεται μέσω διατροφής (Kuan Wong et al., 2020).

iii) β-καροτενοειδή:

Τα β-καροτενοειδή ανήκουν στην ευρύτερη κλάση των καροτενοειδών και έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Siti et al., 2015a). Σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου μπορούν να δεσμεύουν το μονομοριακό οξυγόνο και να εξουδετερώσουν ελεύθερες ρίζες όπως αυτή του υδροξυλίου ή του περοξυλίου (X. Li et al., 2013).

iv) Φλαβονοειδή:

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, απαντώνται στα φυτά και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής (Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer). Θεωρούνται φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία ασκούν την ικανότητα τους έμμεσα αναστέλλοντας ένζυμα υπεύθυνα για την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως είναι η οξειδάση του NADPH (L. J. Su et al., 2019).

v) Γλουταθειόνη:

Η γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο (Rushworth & Megson, 2014). Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο με αμινοξική αλληλουχία γ-Glu-Cys-Gly. Λόγω της πλευρικής αλυσίδας της κυστεΐνης, το μόριο της γλουταθειόνης φέρει μια σουλφυδρυλική ομάδα και η δομή της μεταπίπτει μεταξύ της ανηγμένης μορφής της (GSH) και της οξειδωμένης (GSSG)(Adeoye et al., 2018). Επιπλέον, αποτελεί μια σεληνοπρωτεΐνη καθώς διαθέτει μια σεληνοκυστεΐνη στο καταλυτικό κέντρο (Glutathione peroxidases). Η γλουταθειόνη χαρακτηρίζεται από την αντιοξειδωτική της δράση διότι αποτελεί υπόστρωμα στη αντίδραση αναγωγής της ρίζας του υπεροξειδίου, η οποία καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Kalinina et al., 2014). Εκτός, όμως, από την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, διατηρεί και τα εξωγενή αντιοξειδωτικά, όπως την βιταμίνη C και E, στην ανηγμένη μορφή τους (Wang et al., 2013).

1.12 Οξειδωτικό στρες:

Το οξειδωτικό στρες ανακαλύφθηκε αρχικά από τον Harmna στην Αγγλία κατά την μελέτη της γήρανσης και στην συνέχεια αναλύθηκε από τον Sies το 1985 (Qi & Dong, 2021). Σήμερα, ο όρος αυτός περιγράφει την ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών (Εικόνα 6 και 7), η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη (Jones, 2006). Μπορεί να προκληθεί λόγω της υπέρμετρης παραγωγής ελευθέρων ριζών είτε λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου. Στην περίπτωση που το κύτταρο δεν επαναφέρει την ισορροπία, τότε η συσσώρευση των ελευθέρων ριζών, ειδικότερα των δραστικών μορφών οξυγόνου, οδηγεί σε διάφορες διαταραχές του μεταβολισμού, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να προκαλέσει και κάποια μοριακή βλάβη (Siti et al., 2015b). Οι παραπάνω μη-φυσιολογικές καταστάσεις είναι αποτέλεσμα οξείδωσης σημαντικών βιομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα (Tan et al., 2018).

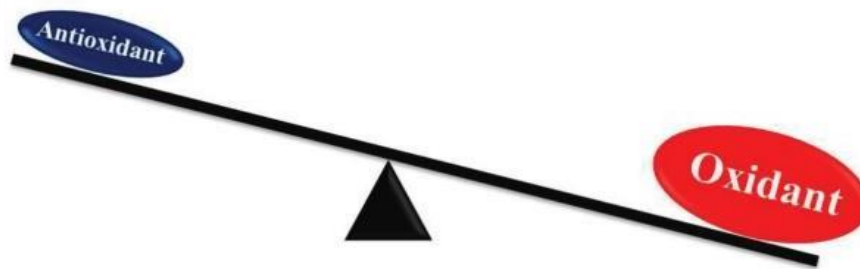
Οι διαταραχές του οξειδωτικού μεταβολισμού του κυττάρου είναι πιθανό να οδηγήσουν σε μια πληθώρα ασθενειών και παθήσεων, όπως είναι ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές νόσοι, η νόσος Πάρκινσον, η αθηροσκλήρωση και ορισμένοι τύποι καρκίνου (Kattoor et al., 2017), (Poprac et al., 2017b).

Normal condition



Εικόνα 6: Η οξειδωτική κατάσταση του κυττάρου επηρεάζεται από την παραγωγή των οξειδωτικών μορίων. Η παραγωγή των οξειδωτικών μορίων και η δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών βρίσκονται σε ισορροπία. Επιτυγχάνεται η οξειδωτική ισορροπία η οποία αντιπροσωπεύει την φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου (Berkaitan et al., 2015).

Oxidative stress



Εικόνα 7: Η υπέρμετρη παραγωγή και συσσώρευση των οξειδωτικών μορίων υπερβαίνει την δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και το κύτταρο οδηγείται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Berkaitan et al., 2015).

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν ο έλεγχος της επίδρασης του μελιού βελανιδιάς και του *Eryngium creticum* στην κυτταρικής βιωσιμότητα και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και protein carbonyls της κυτταρικής σειράς μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7. Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων σε συγκεντρώσεις 3.125, 6.25 και, 25 mg/ml των δειγμάτων μελιού. Ακολούθως, διεξήχθη η εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης μέσω κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρίας.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Προετοιμασία διαλυμάτων

Με σκοπό να πραγματοποιηθεί η εκτίμηση της επίδρασης των δύο ειδών μελιού που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη τόσο στην κυτταρική βιωσιμότητα όσο και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, παρασκευάστηκε διάλυμα ορισμένης συγκέντρωσης. Αναλυτικότερα, μετά την ζύγιση των δειγμάτων σε ζυγό ακριβείας, έγινε διαλυτοποίηση με την προσθήκη απιονισμένου νερού (dH₂O). Η ποσότητα του απιονισμένου νερού προέκυψε σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης, προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολούθησε θέρμανση σε θερμοκρασία 35-40 °C για 5 λεπτά ώστε να προκύψει ομοιογενές δείγμα. Τέλος, κάθε διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία αραιωμένων διαλυμάτων σειριακών συγκεντρώσεων: 3.125 mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml και, 50 mg/ml. Οι σειριακές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση θρεπτικού μέσου DMEM απουσία FBS. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνόταν κάθε φορά πριν από κάθε πείραμα.

3.2 Κυτταρική σειρά

Εκτιμήθηκε η επίδραση των μελιών γαλάζιο αγκάθι και βελανιδιάς στηνκυτταρική σειρά RAW264.7. Πρόκειται για μακροφάγα κύτταρα τα οποία προήλθαν από όγκο που αναπτύχθηκε σε αρσενικό ποντίκι κατόπιν εμβολιασμού με τον ιό λευχαιμίας Abelson (MuLV, Abelson Murine Leukemia Virus) (Hartley et al., 2008). Τα μακροφάγα είναι μυελοειδή κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να εκτελούν φαγοκυττάρωση (Varol et al., 2015), (ATCC, American Type Culture Collection).

3.3 Κυτταροκαλλιέργειες

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων RAW264,7 σε φλάσκες 75 cm² υπό την ύπαρξη συγκεκριμένων συνθηκών με ποσοστό CO₂ στο 5%, και θερμοκρασία 37°C. Οι συνθήκες αυτές παρέμειναν σταθερές στον κλίβανο μέσα στον οποίο επωάζονταν τα κύτταρα , με στόχο να επιτευχθεί πληρότητα 70%-80%. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της συγκεκριμένης σειράς κυττάρων ήταν το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της Gibco (4.5 g / L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη), μέσα στο οποίο εμπεριέχονταν 10% v/v εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS, Fetal Bovine serum), 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη καθώς και 100 μονάδες/ml πενικιλίνη. Ο ορός αυτός ενισχύει την προσκόλληση των κυττάρων στην φλάσκα, παρέχει όχι μόνο επιπλέον θρεπτικά συστατικά αλλά και αυξητικούς παράγοντες που προάγουν την υγιή ανάπτυξη τους.

Όσο αφορά την ανακαλλιέργεια των RAW 264,7 χρησιμοποιήθηκε ξέστρο με σκοπό να αποκολληθούν τα κύτταρα από την φλάσκα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και με την χρήση του αιματοκυτταρομέτρου Neubauer υπολογίστηκε η ποσότητα εναιωρήματος που αντιστοιχούσε σε περιεχόμενο περίπου 2.000.000 κυττάρων. Στην συνέχεια, έγινε μεταφορά της ποσότητας αυτής σε νέα φλάσκα.

3.4 Αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των ειδών μελιού

Η επίδραση των δύο ειδών μελιού ελέγχθηκε μέσω της χρωματομετρικής μέθοδου XTT. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια δοκιμή κυτταροτοξικότητας που διεξάγεται με την βοήθεια αλάτων τετραζολίου. Συγκεκριμένα, βασίζεται στην αναγωγή ενός άλατος τετραζολίου απο τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες προς σχηματισμό ενός υδατοδιαλυτού προϊόντος φορμαζάνης. Το τελικό αυτό προϊόν χαρακτηρίζεται απο έντονο πορτοκαλί χρώμα και μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450 nm (Bancos et al., 2012), (Xu et al., 2016).

Η κυτταρική βιωσιμότητα ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (R&D systems). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων σε πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο, σε τρυβλίο 96 κυψελίδων για 24 ώρες. Σημειώνεται ότι σε κάθε μια από τις κυψελίδες περιέχονταν αρχικά 10.000 κύτταρα. Οι παραπάνω παράμετροι επιλέχθηκαν με σκοπό να επιτευχθεί πληρότητα έως 70%- 80%. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με την χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer. Με το πέρας των 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και εκ νέου επώαση με τα υπό μελέτη δείγματα μελιού σε συγκεντρώσεις 3.125mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml και 50 mg/ml. Η επώαση έγινε σε θρεπτικό μέσο απουσία βόειου ορού για 24 ώρες. Με το πέρας της επώασης, προστέθηκε σε κάθε κυψελίδα 50 μl ενός διαλύματος XTT το οποίο αποτελούταν από 49 μl αντιδραστηρίου XTT και 1 μl ενεργοποιητή XTT. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια τελευταία επώαση 4 ωρών και ακολούθησε μέτρηση των τιμών της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm και στα 630 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA).

Ωστόσο για την διαδικασία αυτή απαιτούνταν και η ύπαρξη μιας ομάδας ελέγχου, η οποία στην προκειμένη περίπτωση ήταν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς βόειο ορό. Επιπλέον, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού σε θρεπτικό μέσο χωρίς βόειο ορό, απουσία κυττάρων ώστε να αφαιρεθούν από τις τιμές των κυττάρων που επώαστηκαν στις συγκεντρώσεις αυτές.

Τελικά, έγινε χρήση των τιμών της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου και αυτών που επώαστηκαν με τις συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού ώστε να βρεθεί η μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας με την βοήθεια της παρακάτω εξίσωσης: Κυτταρική βιωσιμότητα (% μεταβολή από την ομάδα ελέγχου) = (Οπτική απορρόφηση Δείγματος / Οπτική απορρόφηση Ομάδα ελέγχου) × 100. Σημειώνεται πως όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις.

3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση των δύο δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των RAW 264.7, όσο αφορά του δείκτες που προσδιορίστηκαν με φασματοφωτομετρία, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων σε φλάσκες καλλιέργειας των 75cm², ενώ όσο αφορά τους βιοδείκτες των οποίων ο προσδιορισμός έγινε μέσω κυτταρομετρίας ροής, οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία των έξι κυψελίδων.

Σχετικά με την μέτρηση βιοδεικτών με χρήση φασματοφωτομετρίας, μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, έγινε προσθήκη κυτταρικού εναιωρήματος συγκεκριμένης ποσότητας, η οποία αντιστοιχούσε σε περιεχόμενο 4.000.000 κυττάρων κατά προσέγγιση. Ακολούθησε καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο για χρονικό διάστημα 24 ωρών ώστε να επιτευχθεί πληρότητα σε ποσοστό 70%-80%. Αφού απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο, έγινε πλύση των φλασκών με PBS και στην συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες παρουσία των δειγμάτων μελιού συγκέντρωσης 3.125 mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml και, 25 mg/ml σε νέο θρεπτικό μέσο, χωρίς FBS. Με το πέρας της επώασης, απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο και έγινε ακόμα μια πλύση των φλασκών με PBS ώστε στην συνέχεια να προστεθούν 0.5 ml PBS μαζί με αναστολείς πρωτεασών. Σε επόμενο βήμα, χρησιμοποιήθηκε ξέστρο για την αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες και το κυτταρικό εναιώρημα μεταβιβάστηκε σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης των 1.5 ml. Έπειτα, τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον πάγο προκειμένου να διεξαχθεί η διαδικασία εφαρμογής υπερήχων με σκοπό την λύση των κυττάρων. Αυτή περιελάμβανε την εφαρμογή υπερήχων με παλμό 0.7 δευτερόλεπτα και πλάτος κύματος 70%, για 10 δευτερόλεπτα, με ενδιάμεση παύση επίσης 10 δευτερολέπτων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στους 4°C για 20 λεπτά στα 15000g και το κυτταρόλυμα λήφθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό των βιοδεικτών μέσω φασματοφωτομετρίας.

3.5.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με χρήση της μεθόδου Bradford

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων απαιτήθηκε η κανονικοποίηση των βιοδεικτών που προσδιορίστηκαν με την χρήση φασματοφωτομετρίας. Η κανονικοποίηση τους πραγματοποιήθηκε διαιρώντας με την συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης η οποία υπολογίστηκε μέσω χρήσης του αντιδραστήριου Bradford. Στο αντιδραστήριο εμπεριέχεται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue, η οποία αντιδρώντας με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών επιφέρει τον σχηματισμό προϊόντος με μπλε χρώμα και απορρόφηση στα 595 nm.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήριο Bradford

Με σκοπό να παρασκευαστεί 1 L του αντιδραστήριου Bradford, ζυγίστηκαν 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, τα οποία προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Το ποτήρι ζέσεως ήταν εξαρχής καλυμμένο με αλουμινόχαρτο καθώς το συγκεκριμένο διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση και προσθήκη 50 ml αιθανόλης 95% (v/v) και φωσφορικού οξέος 85% (w/v). Ακολούθησε ανάδευση με χρήση μαγνήτη έως ότου το διάλυμα να ομογενοποιηθεί. Τέλος, αυτό ογκομετρήθηκε έως το 1 L με προσθήκη απιονισμένου νερού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε σωληνάκια φυγοκέντρησης, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 20μl PBS και 1ml αντιδραστήριου Bradford για το control ενώ για το δείγμα προστέθηκαν 20μl αραιωμένου σε PBS κυτταρολύματος (1/10) και 1ml αντιδραστήριου Bradford. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με χρήση vortex και επώαση στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα των 15 λεπτών. Με το πέρας της επώασης, μετρήθηκε η απορρόφηση σε πλαστική κυψελίδα στα 595 nm.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Με σκοπό να προσδιοριστεί η συνολική πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρωτεΐνης αναφοράς. Ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης έγινε με βάση τους συντελεστές a και b , οι οποίοι προέκυψαν από την εξίσωση $y=ax+b$ της παραπάνω καμπύλης σε mg/ml.

3.5.2 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με χρήση φασματοφωτομετρίας

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) περιγράφει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών του κυτταρολύματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η TAC υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ελεύθερη ρίζα DPPH • (1,1- διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο), η οποία ανάγεται παρουσία κάποιου δότη υδρογόνου. Αποτέλεσμα της αναγωγής αυτής είναι ο σχηματισμός της αντίστοιχης, πιο σταθερής, υδραζίνης. Αυτή η μετατροπή είναι δυνατόν να μετρηθεί μέσω φασματοφωτομετρίας στα 520 nm.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM, pH=7.4)

M.B(KH₂PO₄) = 136 g/mol

M.B (NaHPO₄) = 178 g/mol

Με σκοπό να παρασκευαστούν 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων, προηγήθηκε η προετοιμασία 400 ml διαλύματος NaHPO₄ συγκέντρωσης 10 mM και 100 ml διαλύματος KH₂PO₄ ίδιας συγκέντρωσης. Για το NaHPO₄ ζυγίστηκαν 0.712g, τα οποία διαλύθηκαν σε 400 ml απεσταγμένου νερού, ενώ για το KH₂PO₄ ζυγίστηκαν 0.136g, τα οποία διαλύθηκαν σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μεταφορά των δύο διαλυμάτων σε ποτήρι ζέσεως και ανάμειξη τους σε αναδευτήρα με σκοπό την παρασκευή του τελικού διαλύματος. Κατά την ανάδευση τους, προστέθηκε NaOH ή HCl 1M έως ότου το pH να φτάσει την τιμή 7.4 .

DPPH (0.1 mM)

MB: 394.32 g / mol

0.02g DPPH διαλύθηκαν σε 5 ml μεθανόλης και ακολούθησε ανάδευση σε vortex. Το διάλυμα αυτό αραιώθηκε με 19.98 ml μεθανόλης, με σκοπό την παρασκευή του αραιωμένου διαλύματος που απαιτείται για την μέθοδο.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτούνταν τουλάχιστον 30 mg πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου Bradford .

Για το control, σε σωληνάκια Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα φωσφορικών αλάτων και 500 μl από το αραιωμένο διάλυμα DPPH, χωρίς την προσθήκη κυτταρικού εναιωρήματος. Όσο αφορά τα σωληνάκια που αντιστοιχούσαν στα δείγματα μελιού στις υπο μελέτη συγκεντρώσεις, προστέθηκαν 500-X μl διαλύματος φωσφορικών αλάτων, 500 μl του αραιωμένου διαλύματος DPPH και X μl κυτταρικού εναιωρήματος. Το X αποτελεί τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε περιεχόμενο συνολικής πρωτεΐνης 30 μg. Ακολούθησε ανάδευση των eppendorfs σε vortex και επώαση για 60 λεπτά. Κατά την επώαση, οι αντιοξειδωτικές ουσίες που εμπεριέχονται στο κυτταρόλυμα εξουδετερώνουν την ελεύθερη ρίζα DPPH προς σχηματισμό της υδραζίνης. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, στους 25°C και στα 15000g. Τέλος, 900 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 520 nm.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως εξής:

A) Μείωση της απορρόφησης (Abs) συγκριτικά με το control: %Abs μείωση = $[(Abs.control - Abs.δείγματος) / Abs.control] \times 100$

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

i) Γίνεται διαίρεση με το 100 ώστε να γίνει μετατροπή της μείωσης της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης

ii) Γίνεται πολλαπλασιασμός με το 50 καθώς η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ κυψελίδας

iii) Γίνεται πολλαπλασιασμός με το πηλίκο $1000/X$, όπου 1000 ο τελικός V αντίδρασης και X τα μl του κυτταρολύματος που αντιστοιχούν σε περιεχόμενο συνολικής πρωτεΐνης 30 μg

iv) Γίνεται διαίρεση του γινομένου με το 1000 για να πραγματοποιηθεί η μετατροπή των L του δείγματος σε ml δείγματος

3.5.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με χρήση φασματοφωτομετρίας

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το οξειδωτικό στρες στο περιβάλλον του κυττάρου οδηγεί στον σχηματισμό ορισμένων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η ένωση που προκύπτει από τη διάσπαση αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Το συγκεκριμένο προϊόν μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της ικανότητάς του να αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Οι ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το TBA αναφέρονται ως TBARS και εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το TBA αναλογίας 1 / 2. Τα επίπεδα των TBARS γίνεται να προσδιοριστούν μέσω φωτομέτρησης στα 530 nm.

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mM, pH=7.4)

MB (Tris) = 121.14 g/mol

MB (HCl) = 36.46 g/mol

Με σκοπό να παρασκευαστούν 100 ml διαλύματος Tris-HCl, έγινε προετοιμασία δύο διαλυμάτων: 25 ml Tris (200mM) και 42ml HCl (0.1N). Για το διάλυμα Tris ζυγίστηκαν 0.61g τα οποία διαλύθηκαν σε 25 ml απεσταγμένου νερού

(dH₂O). Για το διάλυμα HCl διαλύθηκαν 0.42ml του διαλύματος stock 37% HCl (0.1N) σε 42 ml απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και ογκομέτρηση μέχρι τα 100 ml, με χρήση dH₂O. Τέλος, το διάλυμα που προέκυψε πεχαμετρήθηκε μέχρι η τιμή του pH να είναι ίση με 7.4.

Διάλυμα NaSO₄ (2M) – TBA (55mM)

MB (TBA) = 144.1 g/mol

MB (Na₂SO₄) = 142.04 g/mol

Με σκοπό την παρασκευή 100 ml αυτού του διαλύματος ζυγίστηκαν 0.08g θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και 2.84g NaSO₄. Έπειτα, έγινε μεταφορά σε ποτήρι ζέσεως και προσθήκη 10ml dH₂O. Ακολούθησε θέρμανση και ανάδευση έως ότου τα διάλυματα να ομογενοποιηθούν.

TCA 35%

Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση 35ml από διάλυμα TCA 100% και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100ml.

TCA 70%

Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση 70ml από διάλυμα TCA 100% και συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100ml.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon των 15ml προστέθηκαν 400-Χ μl PBS για τα δείγματα, όπου Χ η ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος η οποία απαιτείται για 100μg ολικής πρωτεΐνης, σύμφωνα με την μέθοδο Bradford, και 400μl PBS για το control. Ακολούθησε προσθήκη 500μl Tris-HCl και 500μl 35% TCA, ανάδευση και έπειτα επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκε 1ml NaSO₄-TBA και μεταφορά των falcon στους 95°C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο. Στην συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και

ακολούθησε προσθήκη 1ml TCA 70% και ανάδευση στο vortex. Τέλος, μεταφέρθηκε 1ml σε νέα εppendorfs των 1.5ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 11200g, στους 25°C για 3 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταβιβάστηκε σε γυάλινη κυψελίδα ώστε να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση στα 530 nm.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol} / \text{ml}) = [(\text{Abs.Δείγματος}-\text{Abs.Control}) / 0.156 \times (3400 / X)] / 1000$$

Η τιμή 0.156 προκύπτει από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που ισούται με 156000 (mol/L), διαιρούμενο με 10^{-6} , με σκοπό να γίνει η μετατροπή από mol/L σε $\mu\text{mol}/\text{L}$. Επίσης, γίνεται πολλαπλασιασμός με το πηλικό $3400 / X$ ώστε να ληφθεί υπόψη ο τελικός V της αντίδρασης, που ισούται με 3400 μl καθώς και η ποσότητα του κυτταρικού ελαιωρήματος (X μl) που προστίθεται στην αντίδραση με σκοπό να η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης να είναι $>30\mu\text{g}$, με βάση την μέθοδο Bradford. Η διαίρεση με το 1000 πραγματοποιείται ώστε να γίνει η μετατροπή των $\mu\text{mol}/\text{L}$ σε $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

3.5.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μέσω φασματοφωτομετρίας

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν έναν αξιόπιστο και ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη της οξειδωσης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες είναι σταθερά μόρια και η καρβονυλίωση τους συνοδεύεται από βλάβες οι οποίες είναι μη αναστρέψιμες και οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας τους. Όταν μια πρωτεΐνη καρβονυλιώνεται σε μέτριο βαθμό, τότε είναι δυνατόν να διασπαστεί από το πρωτεόσωμα. Αντιθέτως, αν το ποσοστό των βλαβών είναι μεγάλο, τότε δεν γίνεται να διασπαστεί και συγκεντώνεται με άλλες καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων γίνεται να ανιχνευτεί μέσω την ικανότητάς τους να αντιδρούν με το DNPΗ (2,4 – δινιτροφαιλυδραζίνη) σχηματίζοντας το 2,4 – δινιτροφαιλυδραζόνιο,

του οποίου η ανίχνευση μπορεί πραγματοποιηθεί μέσω φωτομέτρησης στα 375 nm.

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

Διάλυμα HCl 2.5 N

Με σκοπό να παρασκευαστούν 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, έγινε προσθήκη 24.6 ml του διαλύματος 37% HCl (10.1 N HCl) σε 70 ml απεσταγμένου νερού και ογκομέτρηση με dH₂O ώσπου ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 100 ml. Η προσθήκη του HCl πραγματοποιήθηκε αργά διότι το διάλυμα αυτό είναι πολύ καυστικό.

DNPH (14 mM)

MB = 198.1 g/mol

Με σκοπό να παρασκευαστούν 100 ml διαλύματος, ζυγίστηκαν 0.2833 g DNPH τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε 100 ml 2.5 N HCl.

TCA 10%

Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση 10 ml του διαλύματος TCA 100 % και συμπλήρωσε με απεσταγμένο νερό ώσπου ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 100 ml.

Ουρία (5 M, pH = 2.3) M.B= 60.06 g/mol

Με σκοπό να παρασκευαστούν 100 ml, 30 g ουρίας διαλύθηκαν σε 70 ml απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε ογκομέτρηση με dH₂O έως ότου ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 100 ml.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, σε φιαλίδια eppendorf των 1.5ml προστέθηκαν 400 – X μl PBS, με το X να αποτελεί την ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα συνολικής πρωτεΐνης τουλάχιστον 100μg, μέσω υπολογισμών με χρήση της μεθόδου Bradford. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 0.5 ml DNPH (14mM) για

τα δείγματα ενώ για τα τυφλά πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0.5 ml HCl (2.5N). Σημειώνεται πως κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Τα φιαλίδια αναδεύτηκαν στο vortex και ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα 1 ώρας, σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την διάρκεια της επώασης πραγματοποιούνταν ενδιάμεσες αναδεύσεις ανά 15 λεπτά. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 15000g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε 1ml διαλύματος TCA 10% και πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του ιζήματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 15000g. Στην συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε η 1 ml μίγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία (1:1 v/v). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 15000g. Εάν ήταν απαραίτητο, έγινε επανάληψη της φυγοκέντρησης και απομάκρυνσης του υπερκειμένου για άλλη μια φορά. Έπειτα, προστέθηκε ποσότητα 1 ml από το διάλυμα της ουρίας (5M και pH=2.3). Τα eppendorfs αναδεύτηκαν στο vortex και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 15000g και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία ώστε να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση στα 375 nm.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml) = [(Abs.Δείγμα-Abs.Τυφλό)/0.022 x (1000/X)].

Η τιμή 0.022 προκύπτει από τον μοριακό συντελεστή απόσβεσης του DNPH, ενώ το πηλίκο 1000 / X είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μl στην κυψελίδα / X μl του δείγματος). Η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg)= (συγκέντρωση καρβονύλιων nmol/mL) / (συγκέντρωση πρωτεΐνης mg/mL).

3.5.5 Προσδιορισμός των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στο κύτταρο μέσω κυτταρομετρίας ροής

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η κυτταρομετρία ροής στηρίζεται στην χρήση της διοξικής 2',7'-διγλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCFDA), μιας ουσίας η οποία αποτελεί έναν από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές στην μέτρηση των επιπέδων ROS εντός του κυττάρου. Όταν εισέλθει μέσα στο κύτταρο μέσω διάχυσης, υφίσταται αποακετυλίωση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 2',7'-διγλωροδιϋδροφθοροσκεΐνης (H₂DCF). Η τελευταία αποτελεί μια φθορίζουσα ουσία, η ύπαρξη της οποίας εξακριβώνεται μετρώντας την ένταση του φθορισμού στα 530 nm με μήκος κύματος διέγερσης 488.

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

H₂DCFDA (10μM)

Με σκοπό να παρασκευαστούν 10 ml διαλύματος H₂DCFDA συγκέντρωσης 20μM, έγινε διαλυτοποίηση 1.94 mg H₂DCFDA σε 10 ml DMSO. Στην συνέχεια, 0.01 ml του διαλύματος αυτού αραιώθηκαν σε 19.990 ml PBS με σκοπό την παρασκευή του τελικού διαλύματος H₂DCFDA 10 μM.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων RAW 264.7 σε τρυβλίο των 6 κυψελίδων, σε θρεπτικό μέσο για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Σε κάθε κυψελίδα περιέχονταν περίπου 300.000 κύτταρα ώστε να επιτευχθεί πληρότητα έως 70%-80%. Μετά την απόρριψη του θρεπτικού υλικού ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με τα δείγματα μελιού στις υπό μελέτη συγκεντρώσεις (3.125, 6.25, 12.5 και, 25 mg/ml), σε θρεπτικό μέσο, χωρίς βόειο ορό. Με το πέρας της επώασης, απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο και έγινε πλύση των κυψελίδων με 1 ml PBS. Μετά, το PBS απορρίφθηκε και προστέθηκε 1.5 ml του διαλύματος H₂DCFDA συγκέντρωσης 10 μM σε κάθε κυψελίδα και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε σωληνάκια φυγοκέντρωσης των 1.5 ml και

φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στους 4°C στα 1500g. Στην συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 1 ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρωσης υπο τις ίδιες συνθήκες. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αυτής, απομακρύνθηκε ξανά το υπερκείμενο, ενώ έγινε επαναιώρηση του ιζήματος με 0.5 ml PBS. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια κυτταρομέτρου για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα, με ρυθμό ροής περίπου 500 κύτταρα ανα δευτερόλεπτο, ενώ η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

3.5.6 Προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) στο κύτταρο μέσω κυτταρομετρίας ροής.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα επίπεδα της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης στο κύτταρο προσδιορίστηκαν με την χρήση του δείκτη Thiol Green, ο οποίος αποτελεί έναν ευαίσθητο ανιχνευτήθειολικών ενώσεων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα του συγκεκριμένου ανιχνευτή να αντιδρά με ενώσειςθειόλης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός φθορίζοντος προϊόντος με πράσινο χρώμα. Η ανίχνευση αυτής της πράσινης, φθορίζουσας ουσίας πραγματοποιείται μετρώντας τηνένταση του φθορισμού στα 525 nm και μήκος διέγερσης 490.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Thiol Green Indicator

Με σκοπό να παρασκευαστούν 10 ml του αντιδραστηρίου πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 0.05 ml του εμπορικά διαθέσιμου Thiol Green Indicator με 9.95 ml PBS.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων RAW 264.7 σε τρυβλίο των 6 κυψελίδων, σε θρεπτικό μέσο για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Σε κάθε κυψελίδα περιέχονταν περίπου 300.000 κύτταρα ώστε να επιτευχθεί πληρότητα έως 70%-80%.

Μετά την απόρριψη του θρεπτικού υλικού ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες με τα δείγματα μελιού στις υπο μελέτη συγκεντρώσεις (3.125, 6.25, 12.5 και, 25 mg/ml), σε θρεπτικό μέσο, χωρίς βόειο ορό. Με το πέρας της επώασης, απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο και έγινε πλύση των κυψελίδων με 1 ml PBS. Μετά την απόρριψη του PBS, προστέθηκαν 0.25 ml θρυψίνης σε κάθε κυψελίδα και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο, χρονικού διαστήματος 30 δευτερολέπτων, με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα. Στην συνέχεια, προστέθηκε 1 ml θρεπτικού μέσου, παρουσία βόειου ορού, ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια φυγοκέντρησης των 1.5 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στους 4°C, στα 1500g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 1 ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρησης υπό τις ίδιες συνθήκες. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αυτής, απορρίφθηκε ξανά το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε με την προσθήκη 1 ml διαλύματος Thiol Green. Μετά από επώαση 30 λεπτών, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 0.5 ml PBS. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια κυτταρομέτρου για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα, με ρυθμό ροής περίπου 500 κύτταρα ανα δευτερόλεπτο, ενώ η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

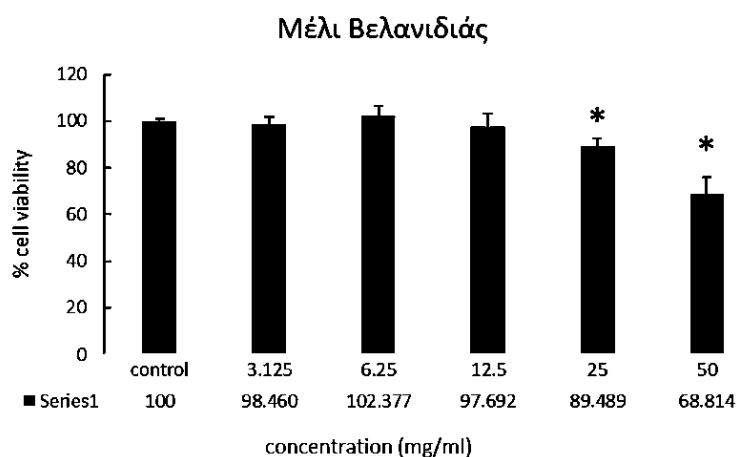
3.6 Στατιστική ανάλυση

Για την σύγκριση των μέσων όρων των υπο μελέτη συγκεντρώσεων με το μέσο όρο της ομάδας control πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω Unpaired t – test. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM), ο οποίος έχει προκύψει από 3 πειράματα, ανεξάρτητα μεταξύ τους, ενώ οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0.05$.

4. Αποτελέσματα

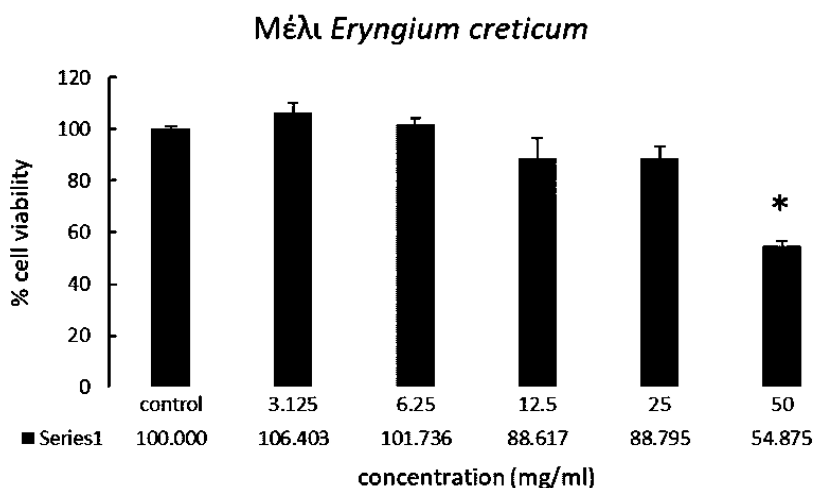
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων μελιού στα RAW264.7

Με σκοπό να γίνει αποτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού πραγματοποιήθηκε η χρωματική μέθοδος XTT. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των τοξικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων στα κύτταρα RAW264.7. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το μέλι βελανιδιάς, δεν σημείωσε κάποια επίδραση στα 3.125 mg/ml, 6.25 mg/ml και στα 12.5 mg/ml. Αντιθέτως, η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας που προκάλεσε στα 25 mg/ml και στα 50 mg/ml, συγκριτικά με την ομάδα control, ήταν στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



*Διάγραμμα 1: Η επίδραση κάθε μιας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού βελανιδιάς στην κυτταρική βιωσιμότητα των RAW 264.7, έπειτα από 24 ώρες επώασης. * : Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ($p < 0.05$).*

Όσο αφορά το δείγμα γαλάζιο Αγκάθι, δεν προκάλεσε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας συγκριτικά με την ομάδα control, παρά μόνο στην υψηλότερη από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, στα 50 mg/ml, όπου παρατηρήθηκε μείωση αυτής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Η επίδραση κάθε μιας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού «Γαλάζιο Αγκάθι» (*Eryngium creticum*) στην κυτταρική βιωσιμότητα των RAW 264.7, έπειτα από 24 ώρες επώασης.

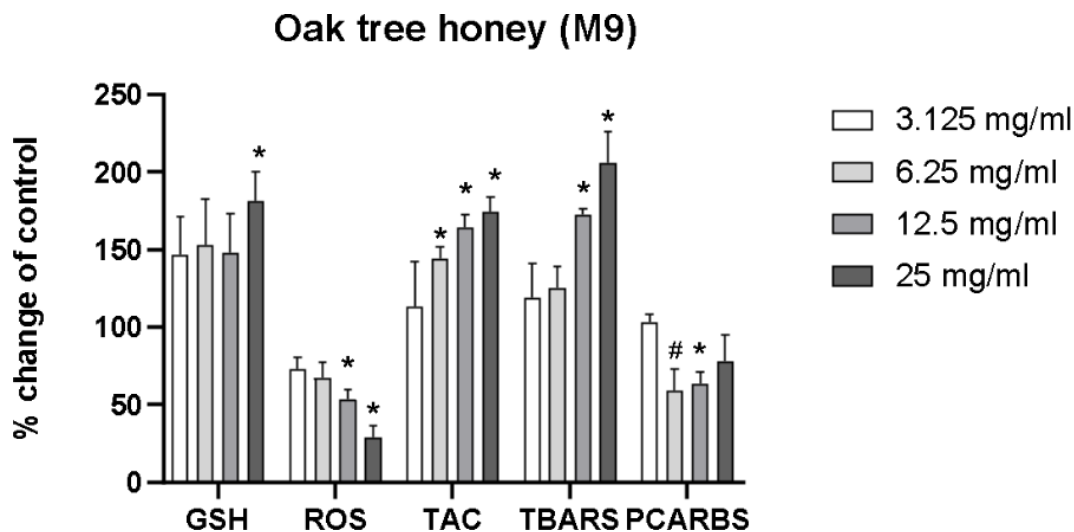
* : Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ($p < 0.05$).

4.2 Προσδιορισμός των επιδράσεων των δειγμάτων μελιού σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7

Αφού εκτιμήθηκαν οι κυτταροτοξικές επιδράσεις των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού στα RAW 264.7 σε ορισμένες συγκεντρώσεις, έπειτα από επώαση 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιδράσεων τους σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, υπό τις ίδιες συνθήκες επώασης. Συγκεκριμένα, έγινε αξιολόγηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων TAC, ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης GSH και δραστικών μορφών οξυγόνου ROS, τα οποία επίπεδα υποδηλώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα. Παράλληλα, εξετάστηκαν και τα επίπεδα των βιοδεικτών TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που υποδεικνύουν σοβαρή οξειδωτική βλάβη σε επίπεδο λιπιδίων και πρωτεϊνών, αντίστοιχα.

Όσο αφορά το μέλι βελανιδιάς, μελετήθηκε η επίδραση του στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml – 25 mg/ml. Η συγκέντρωση 50 mg/ml, λόγω της υψηλής κυτταροτοξικής δράσης που εμφάνισε στα RAW264.7, με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου XTT, δεν εξετάστηκε σε αυτό το κομμάτι της μελέτης.

Σχετικά με τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης GSH, σημειώθηκε μια στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control στα 25 mg/ml, ενώ όσο αφορά τα επίπεδα των ROS, υπήρξε στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα control στα 12.5 mg/ml και στα 25 mg/ml. Στα επίπεδα της TAC, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control στα 6.25 mg/ml, στα 12.5 mg/ml και στα 25 mg/ml. Επίσης, τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα control στα 12.5 mg/ml και στα 25 mg/ml, ενώ αυτά των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση στα 12.5 mg/ml. Ωστόσο, στα 6.25 mg/ml φάνηκε να υπάρχει ισχυρή τάση μείωσης συγκριτικά με την ομάδα control, όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.

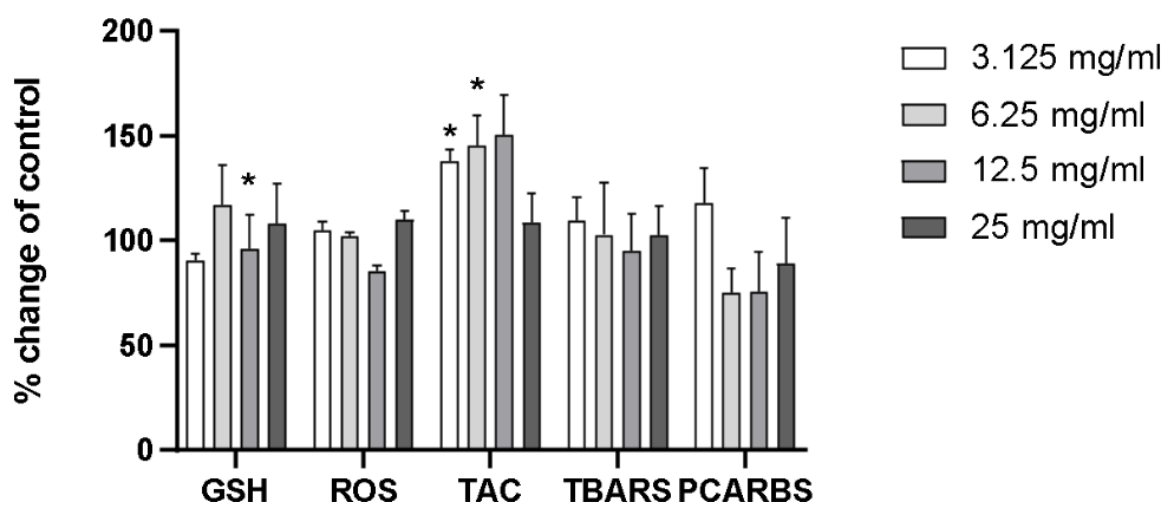


Διάγραμμα 3: Η επίδραση κάθε μιας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού βελανιδιάς σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των RAW 264.7, έπειτα από 24 ώρες επώασης.

*: Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ($p < 0.05$)

: Ισχυρή τάση μεταβολής συγκριτικά με την ομάδα control ($p < 0.08$)

Στην περίπτωση του μελιού γαλάζιο αγκάθι, μελετήθηκε ομοίως η επίδραση του στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml – 25 mg/ml. Σχετικά με τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης GSH, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση συγκριτικά με την ομάδα control στα 12.5 mg/ml, ενώ όσο αφορά τα επίπεδα της TAC, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση συγκριτικά με την ομάδα control στα 3.125 mg/ml και στα 6.25 mg/ml. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4: Η επίδραση κάθε μιας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού «Γαλάζιο αγκάθι» σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των RAW 264.7, έπειτα από 24 ώρες επώασης.

* : Στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control ($p < 0.05$)

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της επίδρασης του μελιού βελανιδιάς και του *Eryngium creticum* τόσο στην βιωσιμότητα όσο και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και protein carbonyls της κυτταρικής σειράς μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7.

Το μέλι έχει προσεγγίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών εδώ και πολλά χρόνια και αποτελεί αντικείμενο μελέτης λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του (Almasaudi, 2021). Η ιστορία του μελιού, από τον τρόπο παραγωγής, συλλογής αλλά και χρήσης του, είναι εξαιρετικά μεγάλη και παρουσιάζει πολλές διαφορές μεταξύ των λαών και των γεωγραφικών περιοχών. Ωστόσο, ένα κοινό αποτελεί το γεγονός ότι εκτός από την ιδιότητα του ως φυσικό γλυκαντικό, ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται έως και σήμερα, αφορά την ευζωία του ανθρώπου. Χάρη στη χημική του σύσταση, η οποία συμπεριλαμβάνει συστατικά όπως είναι οι βιταμίνες, τα αμινοξέα καθώς και μια πληθώρα φλαβονοειδών, το μέλι αναγνωρίζεται ως μια από τις πιο διαδεδομένες τροφές υψηλής αξίας (Cianciosi et al., 2018b). Επιπλέον, η φυτική του προέλευση σε συνδυασμό με τις ευεργετικές ιδιότητες που προσφέρει στον ανθρώπινο οργανισμό, το έχουν τοποθετήσει όχι μόνο στην κορυφή των οφέλιμων για την υγεία τροφών αλλά και σε υψηλή θέση στην κλίμακα των ακριβών ειδών διατροφής (Tsagkaris et al., 2021).

Η χημική σύσταση του μελιού και το εύρος της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (Tashkandi, 2021b). Ανάμεσα σε αυτούς είναι η πρώτη ύλη από την οποία παράγεται το μέλι, δηλαδή από το νεκταρ των ανθέων ή από μελιτώσεις εκκρίσεις των εντόμων και των ίδιων των φυτών, όπως και η βοτανική και η γεωγραφική του προέλευση (Scholz et al., 2020).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα είδη του μελιού που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της μελέτης ήταν δύο: το Γαλάζιο αγκάθι και το μέλι βελανιδιάς. Το πρώτο παράγεται από μια μεγάλη ποικιλία βοτάνων και αγριολουλούδων, αλλά στο μεγαλύτερο ποσοστό προέρχεται από το φυτό «Κρητικό ερύγγιο» (*Eryngium creticum*), γνωστό και ως «Γαλάζιο αγκάθι».

Για να διερευνηθεί η επίδραση των δύο ειδών μελιού της μελέτης στην κυτταρική βιωσιμότητα των RAW264.7, εφαρμόστηκε η μέθοδος XTT, μια μέθοδος ελέγχου της κυτταροτοξικότητας. Τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν έδειξαν την κυτταροτοξική δράση τόσο του μελιού βελανιδιάς όσο και του γαλάζιου αγκαθιού, στην υψηλότερη από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, δηλαδή στα 50 mg/ml. Ωστόσο, όσον αφορά το μέλι βελανιδιάς, παρατηρήθηκε ότι προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας συγκριτικά με την ομάδα control και στα 25 mg/ml, σε αντίθεση με το γαλάζιο αγκάθι το οποίο δεν σημείωσε κάποια σημαντική μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας στην συγκεκριμένη συγκέντρωση. Από το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτό ότι οι κυτταροτοξικές επιδράσεις του μελιού βελανιδιάς ήταν πιο ισχυρές στα RAW264.7 σε σύγκριση με αυτές του γαλάζιου αγκαθιού. Σε μια άλλη μελέτη, στην οποία εξετάστηκε η επίδραση του μελιού Manuka στην κυτταρική βιωσιμότητα των RAW264.7 μετά από επώαση 24 ωρών, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα control σε συγκεντρώσεις στις οποίες το μέλι βελανιδιάς και το γαλάζιο αγκάθι δεν σημείωσαν κάποια μεταβολή (Afrin et al., 2018). Αντιθέτως, όταν τα RAW264.7 επώαστηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα με εκχυλίσματα μελιού *Echium plantaginum L.* (Έχιον το πλαντάγινον) συγκέντρωσης 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 και 0.50 mg/ml, προκλήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με το control στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (Moreira et al., 2020). Επιπρόσθετα, σε μελέτη της επίδρασης μελιού από το δέντρο *Melaleuca spp*, το οποίο απαντάται στην Μαλαισία, στην ίδια κυτταρική σειρά, δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξική δράση, έπειτα επώαση των κυττάρων για 24 ώρες, σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0.039, 0.078, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 και 5 mg/ml). Επιπρόσθετα, σε μια συγκριτική μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης του μελιού από το δέντρο *Melaleuca spp* (Gelam honey) με και χωρίς την προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα, στα κύτταρα RAW264.7, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην κυτταρική βιωσιμότητα απουσίας του οξειδωτικού παράγοντα σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0.039, 0.078, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 και 5 mg/ml). Ωστόσο, παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα control στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Kassim et al., 2012).

Αφού αξιολογήθηκαν οι επιπτώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων μελιού στην βιωσιμότητα των κυττάρων, μελετήθηκε και η επίδραση της κάθε συγκέντρωσης τους, είτε αυτή είχε χαρακτηριστεί ως υποτοξική είτε ως τοξική, σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Αναλυτικότερα, μετά από επώαση ενός χρονικού διαστήματος των 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των επιδράσεων στα επίπεδα ROS και GSH εντός του κυττάρου, μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπως και στα επίπεδα της TAC με τη χρήση φασματοφωτομετρίας. Ταυτόχρονα, έγινε αποτίμηση και των επιδράσεων στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS, επίσης με τη χρήση φασματοφωτομετρίας.

Όσον αφορά το μέλι βελανιδιάς, μετά την επώαση των κυττάρων RAW264.7 για 24 ώρες, παρατηρήθηκαν μεταβολές όχι μόνο στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS και της GSH, αλλά και στα επίπεδα της TAC, όπως και στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συγκεκριμένα, η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα των 25 mg/ml προκάλεσε αύξηση της GSH, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ομάδα control, ενώ σημειώθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ROS. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι το ζεύγος GSH/GSSG αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά οξειδοαναγωγικά συστήματα (Veskoukis et al., 2019), καθώς με την χορήγηση των 25 mg/ml ενεργοποιήθηκε ο συγκεκριμένος μηχανισμός αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH, με σκοπό να παρεμποδιστεί η επαγωγή του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο από την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, η χορήγηση των 12.5 mg/ml δείγματος μελιού βελανιδιάς οδήγησε, επίσης, σε στατιστικά σημαντική μείωση των ROS σε σύγκριση με την ομάδα control, ενώ δεν υπήρχε ισχυρή αύξηση των επιπέδων GSH στην συγκεκριμένη περίπτωση. Στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν σημειώθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των ROS και της GSH. Σε μελέτη εξετάστηκε η ενδοκυτταρική παραγωγή των ROS σε καρκινικά κύτταρα HCT-116, μετά από επώαση με συγκεντρώσεις 3, 6, 9 και 12 mg/ml του μελιού από το δέντρο *Arbutus unedo L.* (Strawberry tree honey) και του μελιού Manuka για 24, 48 και 72 ώρες. Πρόκειται για κύτταρα που προήλθαν από αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου που αναπτύχθηκε σε αρσενικό άτομο. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν στατιστικώς σημαντική αύξηση των ROS σε σύγκριση με την ομάδα control σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και στα δύο είδη μελιού (Afrin et al., 2017).

Προχωρώντας στην εκτίμηση των επιδράσεων στους βιοδείκτες οξειδωτικού κατάστασης TAC, TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η επώαση των RAW264.7 με το δείγμα των 25 mg/ml οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, TAC, του κυττάρου, όπως και των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των TBARS, ενώ τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκαν, αλλά όχι σημαντικά. Είναι γνωστό ότι σχηματισμός των TBARS και η μέτρηση τους μέσω φασματοφωτομετρίας είναι μια μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, όπως αντίστοιχα, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αντανακλούν τον βαθμό καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου ήταν ανεπαρκής, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προστατευτεί το κύτταρο από την παραγωγή μοριών που προκαλούν οξειδωτική βλάβη. Μετά την χορήγηση των 12.5 mg/ml του συγκεκριμένου δείγματος, παρατηρήθηκαν όμοια αποτελέσματα, με τα επίπεδα της TAC και των TBARS να έχουν αυξηθεί στατιστικώς σημαντικά. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση σημειώθηκε και μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική. Παρόλα αυτά, κρίνοντας από τα αυξημένα επίπεδα των TBARS, και πάλι δεν ήταν επαρκής η δράση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Εν συνεχεία, η χορήγηση των 6.25 mg/ml φάνηκε να προκαλεί μια ισχυρή τάση για μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντιθέτως, υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της TAC σε σύγκριση με την ομάδα control. Τελικά, στην συγκεκριμένη δοσολογία η δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου ήταν πιο αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των μοριών που προκαλούν οξειδωτική βλάβη, καθώς ενώ σημειώθηκε κάποια αύξηση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των TBARS, δεν ήταν στατιστικά σημαντική, σε αντίθεση με την περίπτωση στην οποία χορηγήθηκαν 25 mg/ml και 12.5 mg/ml του δείγματος. Τελευταία παρατήρηση όσον αφορά την επίδραση του συγκεκριμένου δείγματος μελιού, ήταν το γεγονός ότι στην πιο μικρή συγκέντρωση, δηλαδή στα 3.25 mg/ml, δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα control. Αντιθέτως, σε μελέτη της επίδρασης του μελιού από το δέντρο *Arbutus unedo* L. στα HCT-116, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων TBARS έπειτα από επώαση των κυττάρων με συγκεντρώσεις 3, 6, 9, και 12 mg/ml για 48 ώρες, ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στις συγκεντρώσεις 6, 9 και 12 mg/ml. Στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε και η επίδραση του

μελιού αυτού στα ενδοκυτταρικά επίπερα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε μη-καρκινικά κύτταρα (human dermal fibroblasts), μετά από επώαση 48 ωρών σε συγκεντρώσεις

12 και 40 mg/ml. Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν σημειώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (Afrin, Forbes-Hernández, et al., 2019).

Σχετικά με το δεύτερο υπό μελέτη δείγμα μελιού, το *Eryngium creticum*, παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στην επίδραση του στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων σε σύγκριση με αυτή του δείγματος μελιού βελανιδιάς. Πιο αναλυτικά, στα 25 mg/ml δεν σημειώθηκε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με την ομάδα control σε κανέναν από τους βιοδείκτες. Ωστόσο, η χορήγηση των 12.5 mg/ml προκάλεσε μια σημαντική αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH. Όσο αφορά τα επίπεδα των ROS, φάνηκε να μειώθηκαν, αλλά όχι σημαντικά. Σε αυτήν την περίπτωση η μείωση των ROS αντικατοπτρίζει την επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, μέσω αύξησης της GSH, παρά το γεγονός ότι δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Τέλος, ένα αποτέλεσμα το οποίο παρουσίασε μεγάλο ενδιαφέρον, αποτέλεσε το γεγονός ότι με την χορήγηση της μικρότερης συγκέντρωσης από τις υπόλοιπες που εξετάστηκαν, δηλαδή αυτή των 3.125 mg/ml, προκλήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της TAC σε σύγκριση με την ομάδα control, ενώ ταυτόχρονα υπήρξε και αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που όμως δεν ήταν σημαντική. Από αυτό συμπεραίνεται ότι στην συγκεκριμένη δοσολογία, αν και μικρότερη από τις εξεταζόμενες, ενεργοποιήθηκαν αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου οι οποίοι κατάφεραν σε οριακό επίπεδο να προστατεύσουν τις πρωτεΐνες από την καρβονυλίωση. Πρόκειται για μια διαδικασία η οποία είναι μη αναστρέψιμη και υποδηλώνει σοβαρή οξειδωτική βλάβη. Σε περιπτώσεις όπου οι πρωτεΐνες έχουν σημαντικές βλάβες λόγω μεγάλου βαθμού τροποποιήσεων, σχηματίζουν μεγάλα συσσωματώματα τα οποία οδηγούν στην αναστολή της λειτουργίας του 20S πρωτεασώματος και κατά συνέπεια στον κυτταρικό θάνατο (Akagawa, 2021).

Συμπερασματικά, η μελέτη της επίδρασης του μελιού βελανιδιάς και του *Eryngium creticum* στην κυτταρική βιωσιμότητα και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και protein carbonyls σε κυτταρική

σειρά μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7, υπέδειξαν την κυτταροτοξική δράση και των δύο δειγμάτων στην συγκέντρωση 50 mg/ml, ωστόσο, το μέλι βελανιδιάς παρουσίασε χαμηλότερο κατώφλι κυτταροτοξικότητας στην μέθοδο ΧΤΤ. Επιπλέον, το δείγμα μελιού βελανιδιάς ενεργοποίησε τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, προλαμβάνοντας την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών στην συγκέντρωση 6.25 mg/ml ενώ προκάλεσε οξειδωτικό στρες μέσω της προαγωγής της λιπιδικής υπεροξειδωσης στην συγκέντρωση 25 mg/ml. Όσο αφορά το μέλι *Eryngium creticum*, αυτό προκάλεσε μεμονωμένες θετικές επιδράσεις στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυτταρικού συστήματος και συγκεκριμένα οδήγησε στην ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου μέσω της αύξησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Βιβλιογραφία

- Abid, M. R., & Sellke, F. W. (2016). Subcellular ROS Signaling in Cardiovascular Disease. In *Free Radicals and Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64570>
- adam-vizi2005. (n.d.).
- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiania, O. (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(1), 61–66. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180003>
- Afrin, S., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Pistollato, F., Zhang, J. J., Pacetti, M., Amici, A., Reboredo-Rodríguez, P., Simal-Gandara, J., Bompadre, S., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2019). Strawberry tree honey as a new potential functional food. Part 2: Strawberry tree honey increases ROS generation by suppressing Nrf2-ARE and NF-κB signaling pathways and decreases metabolic phenotypes and metastatic activity in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 57, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.037>
- Afrin, S., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., Bompadre, S., Quiles, J. L., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F., & Battino, M. (2017). Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and Increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey. *Int. J. Mol. Sci*, 18, 613. <https://doi.org/10.3390/ijms18030613>
- Afrin, S., Gasparini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P. P., Battino, M., & Giampieri, F. (2018). Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 1: Enhancement of cellular viability, regulation of cellular apoptosis and improvement of mitochondrial functionality. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.001>
- Afrin, S., Haneefa, S. M., Fernandez-Cabezudo, M. J., Giampieri, F., al-Ramadi, B. K., & Battino, M. (2019). *Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: an evidence-based review*. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000192>
- Ahmad Bhat, B., TACHisti, K., & Sabahat Ashraf, S. (n.d.). *A Study on Assessment of Consciousness Regarding Health Benefits of Honey Use Among People of Central Kashmir*. 27(01). www.buddhisma2z.com
- Ahmad, R. S., Hussain, M. B., Saeed, F., Waheed, M., & Tufail, T. (2017). Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey: A concurrent review. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295257>, 20, S254–S269. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295257>
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018a). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018b). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition and Metabolism*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-61/TABLES/4>
- Akagawa, M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. In *Free Radical Research* (Vol. 55, Issue 4, pp. 307–320). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>
- Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 4, pp. 2188–2196). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>
- Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., & al Ghamdi, A. A. (2011). Honey and microbial infections: A review supporting the use of honey for microbial control. In *Journal of*

- Medicinal Food* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1079–1096).
<https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0161>
- Bancos, S., Tsai, D.-H., Hackley, V., Weaver, J. L., & Tyner, K. M. (2012). Evaluation of Viability and Proliferation Profiles on Macrophages Treated with Silica Nanoparticles In Vitro via Plate-Based, Flow Cytometry, and Coulter Counter Assays . *ISRN Nanotechnology*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.5402/2012/454072>
- Bentabol Manzanares, A., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2011a). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, 126(2), 664–672. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.11.003>
- Bentabol Manzanares, A., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2011b). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, 126(2), 664–672. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.11.003>
- Bergamo, G., Seraglio, S. K. T., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2019). Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. *Food Research International*, 116, 745–754.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.09.007>
- Berkaitan, P., Oksidatif, T., & Kajian, S. (2015). Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review. In *Sains Malaysiana* (Vol. 44, Issue 10).
- Bonsignore, G., Patrone, M., Martinotti, S., & Ranzato, E. (2021). “Green” Biomaterials: The Promising Role of Honey. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(4).
<https://doi.org/10.3390/JFB12040072>
- Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306–313. <https://doi.org/10.1111/JOCD.12058>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Flórez, S. M., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018a). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092322>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Lamas, L. B., Flórez, S. M., Toyos, P. A., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018b). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 9). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L. M., Dias, L. G., Castro, J. J., Tomás, F. A., Barberán, T.-B., Tornadijo, M. Eugenia, & Fresno-Baro, J. J. (2018). *Bioactive Components and Antioxidant and Antibacterial Activities of Different Varieties of Honey: A Screening Prior to Clinical Application*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05436>
- Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., Estevinho, M. M., Sousa-Pimenta, M., Tornadijo, M. E., & Estevinho, L. M. (n.d.). *antibiotics Honey: Another Alternative in the Fight against Antibiotic-Resistant Bacteria?* <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110774>
- Cosmina, M., Gallenti, G., Marangon, F., & Troiano, S. (2016). Attitudes towards honey among Italian consumers: A choice experiment approach. *Appetite*, 99, 52–58.
<https://doi.org/10.1016/J.APPET.2015.12.018>
- Czipa, N., Diósi, G., Phillips, C., & Kovács, B. (n.d.). *Examination of honeys and flowers as soil element indicators*. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6121-1>
- da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.051>
- Deibert, P., König, D., Kloock, B., Groenefeld, M., & Berg, A. (2010). Glycaemic and insulinaemic properties of some German honey varieties. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 762–764. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.103>
- di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources

- in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Ediriweera, E. R. H. S. S., & Premarathna, N. Y. S. (2012). Medicinal and cosmetic uses of Bee's Honey - A review. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 33(2), 178. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.105233>
- El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., & Elmazar, & M. M. (n.d.). *Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08771-8>
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.10.097>
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (n.d.-a). *Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review*. www.mums.ac.ir/basic_medical/en/index
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (n.d.-b). *Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review*. www.mums.ac.ir/basic_medical/en/index
- Farakla, I., Kouli, E., Arditi, J., Papageorgiou, I., Bartzeliotou, A., Papadopoulos, G. E., Mantzou, A., Papathanasiou, C., Dracopoulou, M., Papastamataki, M., Moutsatsou, P., Papassotiriou, I., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2019). Effect of honey on glucose and insulin concentrations in obese girls. *European Journal of Clinical Investigation*, 49(2). <https://doi.org/10.1111/eci.13042>
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjerić, D., & Primorac, L. (2016). Croatian produced unifloral honeys characterised according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 39–48. <https://doi.org/10.1515/JAS-2016-0005>
- forrester2018. (n.d.).
- Fuhrmann, D. C., & Brüne, B. (2017). Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. In *Redox Biology* (Vol. 12, pp. 208–215). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.012>
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. https://doi.org/10.1515/HSZ-2017-0131/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2017-0131_FIG_001.JPG
- Hailu, D., & Belay, A. (2020). Melissopalynology and antioxidant properties used to differentiate *Schefflera abyssinica* and polyfloral honey. *PLOS ONE*, 15(10), e0240868. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240868>
- Hartley, J. W., Evans, L. H., Green, K. Y., Naghashfar, Z., Macias, A. R., Zerfas, P. M., & Ward, J. M. (2008). *Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line*. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-1>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.057>
- Herb, M., Schramm, M., & Filosa, S. (2021). *Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity*. <https://doi.org/10.3390/antiox10020313>
- Hills, S. P., Mitchell, P., Wells, C., & Russell, M. (2019). Honey Supplementation and Exercise: A Systematic Review. *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1586, 11(7), 1586. <https://doi.org/10.3390/NU11071586>
- Hussain, M. B. (2018). Role of Honey in Topical and Systemic Bacterial Infections. In *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (Vol. 24, Issue 1, pp. 15–24). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/acm.2017.0017>
- Ismaiel, S., Kahtani, S. al, Adgaba, N., Al-Ghamdi, A. A., & Zulail, A. (2014). Factors That Affect Consumption Patterns and Market Demands for Honey in the Kingdom of Saudi Arabia. *Food and Nutrition Sciences*, 2014(17), 1725–1737.

- <https://doi.org/10.4236/FNS.2014.517186>
- Jensen, J. D., & Mørkbak, M. R. (2013). Role of gastronomic, externality and feasibility attributes in consumer demand for organic and local foods: The case of honey and apples. *International Journal of Consumer Studies*, 37(6), 634–641. <https://doi.org/10.1111/ijcs.12049>
- Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ars*, 8(9–10), 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ARS.2006.8.1865>
- Kalinina, E. v, Chernov, N. N., & Novichkova, M. D. (2014). REVIEW 1562 Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 79(13), 2999348. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(1), 86–102. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746>
- Karmakar, J., Mukherjee, K., & Mandal, C. (n.d.). *Siglecs Modulate Activities of Immune Cells Through Positive and Negative Regulation of ROS Generation*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.758588>
- Kassim, M., Mansor, M., Suhaimi, A., Ong, G., & Yusoff, K. M. (2012). Gelam Honey Scavenges Peroxynitrite During the Immune Response. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 12113–12129. <https://doi.org/10.3390/ijms130912113>
- Kattoor, A. J., Venkata, N., Pothineni, K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *GENETICS AND GENOMICS*. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Khan, R. U., Naz, S., & Abudabos, A. M. (n.d.). *Towards a better understanding of the therapeutic applications and corresponding mechanisms of action of honey*. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0567-0>
- Konno, T., Melo, E. P., Chambers, J. E., Avezov, E., & Lederkremer, Z. (2021). *cells Intracellular Sources of ROS/H 2 O 2 in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum*. <https://doi.org/10.3390/cells10020233>
- Kuan Wong, S., Chin, K.-Y., & Ima-Nirwana, S. (2020). Vitamin C: A Review on its Role in the Management of Metabolic Syndrome. *International Journal of Medical Sciences*, 2020(11), 1625–1638. <https://doi.org/10.7150/ijms.47103>
- Kuropatnicki, A. K., Kłósek, M., & Kucharzewski, M. (2018). Honey as medicine: historical perspectives. *Https://Doi.Org/10.1080/00218839.2017.1411182*, 57(1), 113–118. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411182>
- Kyriazis, I. D., Skaperda, Z., Tekos, F., Makri, S., Vardakas, P., Vassi, E., Patouna, A., Terizi, K., Angelakis, C., & Kouretas, D. (2021a). Methodology for the biofunctional assessment of honey (Review). *International Journal of Functional Nutrition*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.3892/IJFN.2021.15>
- Kyriazis, I. D., Skaperda, Z., Tekos, F., Makri, S., Vardakas, P., Vassi, E., Patouna, A., Terizi, K., Angelakis, C., & Kouretas, D. (2021b). Methodology for the biofunctional assessment of honey (Review). *International Journal of Functional Nutrition*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.3892/IJFN.2021.15>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X.-F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. In *Journal of Hematology & Oncology* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Li, Y. R., & Zhu, H. (2021). Vitamin C for sepsis intervention: from redox biochemistry to clinical medicine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476, 4449–4460. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04240-z>
- Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A. C. (2020). Honey Volatiles as a Fingerprint for Botanical Origin-A Review on their Occurrence on Monofloral Honeys. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25020374>
- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A.

- (2018). Composición y propiedades de la miel de *Apis mellifera*: una revisión. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 57, Issue 1, pp. 5–37). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- Makhloufi, C., Taïbi, K., & Ait Abderrahim, L. (2020). Characterization of Invertase and Diastase Activities, 5-Hydroxymethylfurfural Content and Hydrogen Peroxide Production of Some Algerian Honeys. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 44(5), 1295–1302. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-00936-x>
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Honey Antibacterial activity Wound healing property Glucose oxidase Non-peroxide effect Medical-grade honey Antimicrobial agents Medicinal property Antimicrobial property Immunomodulatory property. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(2), 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Masad, R. J., Haneefa, S. M., Mohamed, Y. A., Al-Sbiei, A., Bashir, G., Fernandez-Cabezudo, M. J., & Al-Ramadi, B. K. (2021). The Immunomodulatory Effects of Honey and Associated Flavonoids in Cancer. *Nutrients*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/NU13041269>
- Med Sci, T. J., Timuçin ATAYOĞLU, A., Soyulu, M., Silici, S., & İnanç, N. (n.d.). *Turkish Journal of Medical Sciences Glycemic index values of monofloral Turkish honeys and the effect of their consumption on glucose metabolism**. <https://doi.org/10.3906/sag-1502-102>
- Mehta, J., Rayalam, S., & Wang, X. (n.d.). *Cytoprotective Effects of Natural Compounds against Oxidative Stress*. <https://doi.org/10.3390/antiox7100147>
- Meo, S. di, & Venditti, P. (2020). (No Title). <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Miller, A. F. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. In *FEBS Letters* (Vol. 586, Issue 5, pp. 585–595). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>
- Mohd Nasir, N.-A., Sukari Halim, A., Banga Singh, K.-K., Aravazhi Dorai, A., & Muhammad Haneef, M.-N. (2010). Antibacterial properties of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. In *BMC Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 10). <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/31>
- Moisescu, O. I. (n.d.). *A Conceptual Review On Building, Managing And Assessing Brand Loyalty*. <https://www.researchgate.net/publication/259969120>
- Moreira, R., Fernandes, F., Valentão, P., Pereira, D. M., & Andrade, P. B. (2020). Echimium plantagineum L. honey: Search of pyrrolizidine alkaloids and polyphenols, anti-inflammatory potential and cytotoxicity. *Food Chemistry*, 328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127169>
- Nascimento, K. S. do, Gasparotto Sattler, J. A., Lauer Macedo, L. F., Serna González, C. V., Pereira de Melo, I. L., da Silva Araújo, E., Granato, D., Sattler, A., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT*, 91, 85–94. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.01.016>
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.06.010>
- Ng, W. J., Sit, N. W., Ooi, P. A. C., Ee, K. Y., & Lim, T. M. (2020). The Antibacterial Potential of Honeydew Honey Produced by Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) against Antibiotic Resistant Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9120871>
- Nguyen, H. T. L., Panyoyai, N., Kasapis, S., Pang, E., & Mantri, N. (2019). Honey and Its Role in Relieving Multiple Facets of Atherosclerosis. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/NU11010167>
- Nikhat, S., & Fazil, M. (2022). History, phytochemistry, experimental pharmacology and clinical uses of honey: A comprehensive review with special reference to Unani medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 282. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114614>

- Olas, B. (n.d.). *Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans?* <https://doi.org/10.3390/nu12020283>
- Olas, B. (2020). Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 283, 12(2), 283. <https://doi.org/10.3390/NU12020283>
- Orhan, H. İ., Yilmaz, İ., & Tekiner, İ. H. (2022). Maulana and sekanjabin (oxymel): a ceremonial relationship with gastronomic and health perspectives. *Journal of Ethnic Foods*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s42779-022-00127-6>
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bachir Bey, M., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*, 121(2), 561–568. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.12.047>
- Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2018). Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 420–430. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.06.016>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017a). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2017.04.005>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017b). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 38, Issue 7, pp. 592–607). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Poulsen, H. E., Specht, E., Broedbaek, K., Henriksen, T., Ellervik, C., Mandrup-Poulsen, T., Tonnesen, M., Nielsen, P. E., Andersen, H. U., & Weimann, A. (2012). RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 52, Issue 8, pp. 1353–1361). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.009>
- Qi, J. hong, & Dong, F. xu. (2021). The relevant targets of anti-oxidative stress: a review. In *Journal of Drug Targeting* (Vol. 29, Issue 7, pp. 677–686). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1870987>
- Ramsay, E. I., Rao, S., Madathil, L., Hegde, S. K., Baliga-Rao, M. P., George, T., & Baliga, M. S. (2019). Honey in oral health and care: A mini review. *Journal of Oral Biosciences*, 61(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/J.JOB.2018.12.003>
- Rosales, C. (n.d.). *Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity*. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
- Roy, J., Galano, J. M., Durand, T., le Guennec, J. Y., & Lee, J. C. Y. (2017). Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. In *FASEB Journal* (Vol. 31, Issue 9, pp. 3729–3745). FASEB. <https://doi.org/10.1096/fj.201700170R>
- Rushworth, G. F., & Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 141, Issue 2, pp. 150–159). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.006>
- Saqib Ali, S., Ahsan, H., Khalid Zia, M., Siddiqui, T., Halim Khan, F., & Fahim Halim Khan, C. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem*, 44, 13145. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>
- Schievano, E., Finotello, C., Uddin, J., Mammi, S., & Piana, L. (2016). Objective Definition of Monofloral and Polyfloral Honeys Based on NMR Metabolomic Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(18), 3645–3652. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00619>
- Scholz, M. B. dos S., Quinhone Júnior, A., Delamuta, B. H., Nakamura, J. M., Baudraz, M. C., Reis, M. O., Kato, T., Pedrão, M. R., Dias, L. F., dos Santos, D. T. R., Kitzberger, C. S. G., & Bianchini, F. P. (2020). Indication of the geographical origin of honey using its physicochemical characteristics and multivariate analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1896–1903. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04225-3>
- Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Brugnerotto, P., Silva, B., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Quality, composition and health-protective properties of citrus honey:

- A review. *Food Research International*, 143, 110268.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110268>
- Seraglio, S. K. T., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2019). An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Research International*, 119, 44–66.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.028>
- Sharapov, M. G., Gudkov, S. v., & Lankin, V. Z. (2021). Hydroperoxide-Reducing Enzymes in the Regulation of Free-Radical Processes. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 86, Issue 10, pp. 1256–1274). Pleiades journals. <https://doi.org/10.1134/S0006297921100084>
- Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. In *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* (Vol. 28, Issue 2). www.begellhouse.com
- Sharoni, C. C., Lia, S., Reid, Y., & Thornburg, G. P. R. (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften*, 93, 72–79. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0062-1>
- Silva, B., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Fett, R., Dalmarco, E. M., Caon, T., & Costa, A. C. O. (2021). In vitro anti-inflammatory properties of honey flavonoids: A review. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 141.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.110086>
- Simova, S., Atanassov, A., Shishiniova, M., & Bankova, V. (2012). A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 134(3), 1706–1710.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.03.071>
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015a). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). In *Vascular Pharmacology* (Vol. 71, pp. 40–56). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015b). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). In *Vascular Pharmacology* (Vol. 71, pp. 40–56). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Smith, K. E., Weis, D., Scott, S. R., Berg, C. J., Segal, Y., & Claey's, P. (2021). Regional and global perspectives of honey as a record of lead in the environment. *Environmental Research*, 195. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.110800>
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072–1100.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12278>
- Solayman, M., Islam, M. A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M. I., Alam, N., & Gan, S. H. (2016). Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219–233. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12182>
- Spasojević, I. (2011). Free radicals and antioxidants at a glance using EPR spectroscopy. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 48, Issue 3, pp. 114–142).
<https://doi.org/10.3109/10408363.2011.591772>
- Spooner, R., & Yilmaz, Ö. (2011). The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, 12, 12.
<https://doi.org/10.3390/ijms12010334>
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Review Article Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., & Liew, W. P. P. (2018). Nutrients and oxidative stress: Friend or foe? In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited.

- <https://doi.org/10.1155/2018/9719584>
- Tashkandi, H. (2021a). Honey in wound healing: An updated review. *Open Life Sciences*, 16(1), 1091–1100. https://doi.org/10.1515/BIOL-2021-0084/ASSET/GRAPHIC/J_BIOL-2021-0084_FIG_002.JPG
- Tashkandi, H. (2021b). Honey in wound healing: An updated review. In *Open Life Sciences* (Vol. 16, Issue 1, pp. 1091–1100). De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0084>
- Terzo, S., Mulè, F., & Amato, A. (2020). Honey and obesity-related dysfunctions: a summary on health benefits. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 82, 108401. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2020.108401>
- Tsagkaris, A. S., Koulis, G. A., Danezis, G. P., Martakos, I., Dasenaki, M., Georgiou, C. A., & Thomaidis, N. S. (2021). *Honey authenticity: analytical techniques, state of the art and challenges*. <https://doi.org/10.1039/d1ra00069a>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 160, Issue 1, pp. 1–40). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Valverde, S., Ares, A. M., Stephen Elmore, J., & Bernal, J. (2022). Recent trends in the analysis of honey constituents. *Food Chemistry*, 387, 132920. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132920>
- vanEngelsdorp, D., & Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.06.011>
- Vanhanen, L. P., Emmertz, A., & Savage, G. P. (2011). Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry*, 128(1), 236–240. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.064>
- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and tissue specialization. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 33, pp. 643–675). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s In the generation and metabolism of reactive oxygen species. In *Current Opinion in Toxicology* (Vol. 7, pp. 44–51). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
- Venza, I., Venza, M., Visalli, M., Lentini, G., Teti, D., & D’Alcontres, F. S. (2021). ROS as Regulators of Cellular Processes in Melanoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1208690>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. In *Current Opinion in Toxicology* (Vol. 13, pp. 99–109). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
- Viteri, R., Zacconi, F., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Bioactive compounds in Apis mellifera monofloral honeys. *Journal of Food Science*, 86(5), 1552–1582. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15706>
- Vladimirov, Y. A., & Proskurnina, E. v. (2009). Free radicals and cell chemiluminescence. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 74, Issue 13, pp. 1545–1566). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297909130082>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol*, 217(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Y., Chun, O. K., & Song, W. O. (2013). Plasma and Dietary Antioxidant Status as Cardiovascular Disease Risk Factors: A Review of Human Studies. *Nutrients*, 5, 2969–3004. <https://doi.org/10.3390/nu5082969>
- Weidenhamer, J. D., & Callaway, R. M. (n.d.). *Direct and Indirect Effects of Invasive Plants on Soil Chemistry and Ecosystem Function*. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9735-0>

- Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., & Deng, Y. (2016). Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Current Microbiology*, 73(4), 474–482. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>
- Yang, C. S., Ho, C. T., Zhang, J., Wan, X., Zhang, K., & Lim, J. (2018). Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(12), 3063–3068. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05830>
- Yayinie, M., Atlabachew, M., Tesfaye, A., Hilluf, W., & Reta, C. (2021). Quality authentication and geographical origin classification of honey of Amhara region, Ethiopia based on physicochemical parameters. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(3), 102987. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.102987>
- Yeow, S. H. C., Chin, S. T. S., Yeow, J. A., & Tan, K. S. (2013). Consumer purchase intentions and honey related products. *Entrepreneurship Vision 2020: Innovation, Development Sustainability, and Economic Growth - Proceedings of the 20th International Business Information Management Association Conference, IBIMA 2013, 1*, 332–345. <https://doi.org/10.5171/2013.197440>
- Zaid, S. S. M., Ruslee, S. S., & Mokhtar, M. H. (2021). Protective Roles of Honey in Reproductive Health: A Review. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113322>
- Zawawi, N., Chong, P. J., Nadhirah, N., Tom, M., Solehah, N., Anuar, S., Mohammad, S. M., Ismail, N., Jusoh, A. Z., Jazvinš'cak, M., & Jembrek, J. (2021). *molecules Establishing Relationship between Vitamins, Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities in Various Honey Types Academic Editors: Nada Orsolic and*. <https://doi.org/10.3390/molecules26154399>
- Zawawi, N., Chong, P. J., Tom, N. N. M., Anuar, N. S. S., Mohammad, S. M., Ismail, N., & Jusoh, A. Z. (2021). Establishing Relationship between Vitamins, Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities in Various Honey Types. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26154399>
- Zhang, G. Z., Tian, J., Zhang, Y. Z., Li, S. S., Zheng, H. Q., & Hu, F. L. (2021). Investigation of the Maturity Evaluation Indicator of Honey in Natural Ripening Process: The Case of Rape Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/FOODS10112882>
- Zhu, J. (n.d.). *Food Chemistry 4th Edition by Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (1)*. Retrieved September 20, 2022, from https://www.academia.edu/23725260/Food_Chemistry_4th_Edition_by_Belitz_W_Grosch_P_Schieberle_1_