

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΪΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΓΥΡΗΣ ΚΑΙ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ
ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α**



ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΚΟΠΕΛΙΤΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΪΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΥ, ΓΥΡΗΣ ΚΑΙ
ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α

STUDY OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF BEEBREAD AND POLLEN SAMPLES AND
THEIR EXTRACTS AGAINST INFLUENZA A VIRUS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.) Μοριακή Μικροβιολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτρη που μου ανέθεσε τη συγκεκριμένη εργασία, δίνοντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα θέμα συνεχώς αυξανόμενης επιστημονικής αξίας.

Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόρη για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δημητρίου Τηλέμαχο για τις συμβουλές, την υπομονή και τη διαρκή στήριξή του μέχρι και την ολοκλήρωση της εν λόγω μεταπτυχιακής διατριβής. Χωρίς την καθοδήγησή του στον ευρύτερο τομέα της ιολογίας, τίποτα από όσα διαλαμβάνονται στην εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ασύτη-Διδάρα Νίκο για την άψογη συνεργασία που είχαμε, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να μου μεταφέρει όσο το δυνατόν περισσότερες από τις γνώσεις του σχετικά με τις μέλισσες, τα προϊόντα κυψέλης και την αντιβακτηριακή δράση αυτών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τσαδήλα Χριστίνα, μέλος του εργαστηρίου, η οποία, αν και υποψήφια διδάκτορας, ήταν πάντα δίπλα μου, προσφέροντάς μου τη βοήθεια και τη στήριξή της, όποτε τις είχα ανάγκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο των επιστημονικών ερευνών εντοπίζεται η χρήση των προϊόντων κυψέλης, και ιδιαίτερα της γύρης και του μελισσόψωμου, ως εναλλακτικές θεραπείες για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων και ιικών μολύνσεων.

Στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αντιϊκής δράσης δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου έναντι του ιού της γρίπης τύπου Α. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γύρης, δείγματα μελισσόψωμου που παρασκευάστηκαν μέσω τεχνητής ζύμωσης, τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τους κλάσματα, καθώς και κλάσματα γύρης και μελισσόψωμου σε βουτανόλη και νερό.

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, παρασκευάστηκαν, αρχικά, διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων, ώστε να προκύψουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αυτών και ακολούθησε ο έλεγχος της κυτταροτοξικής της δράσης, μέσω της χρωματομετρικής δοκιμασίας MTT. Με βάση τις τιμές που προέκυψαν από τη μέτρηση της απορρόφησης σε κατάλληλο μήκος κύματος, υπολογίστηκε για κάθε δείγμα η τιμή CC_{50} . Κατόπιν, της αραιώσεων των δειγμάτων προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα, μολυσμένης με το στέλεχος H1N1, κυτταροκαλλιέργειας MDCK, οπότε και ακολούθησε ο έλεγχος της αντιϊκής δράσης αυτών. Ο εν λόγω έλεγχος περιλάμβανε την απομόνωση του ιϊκού RNA από τα δείγματα, την αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση του συμπληρωματικού μορίου cDNA και Real-Time PCR. Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} κάθε δείγματος. Τέλος, αφού είχαν υπολογιστεί οι τιμές CC_{50} και IC_{50} , υπολογίστηκε για κάθε δείγμα και ο δείκτης επιλεκτικότητας SI, για τον οποίο ισχύει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιϊκή δράση του δείγματος.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, εξήχθη το συμπέρασμα ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα παρουσιάζουν καλύτερη αντιϊκή δράση έναντι του ιού της γρίπης τύπου Α, συγκριτικά με τα δείγματα γύρης και μελισσόψωμου και τα κλάσματα αυτών. Ωστόσο, απαιτείται η διεξαγωγή μεγαλύτερης κλίμακας ερευνών, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα.

Λέξεις-Κλειδιά: Μελισσόψωμο, Γύρη, Τεχνητή ζύμωση, Πρωτεϊνικά κλάσματα, Κλάσματα βουτανόλης, Υδατικά κλάσματα, Κυτταροκαλλιέργειες MDCK, Αντι-ϊκές ιδιότητες, Ιός της γρίπης τύπου Α, Δοκιμασία MTT, Real-Time PCR, Τιμές CC_{50} , IC_{50} και SI.

ABSTRACT

In recent years, the focus of scientific research has been on the use of beehive products, and especially pollen and beebread, as alternative remedies for the treatment of bacterial and viral infections.

The aim of the present study was to test the antiviral activity of pollen and beebread samples against influenza type A virus. The samples that were used during this study were: a pollen sample, beebread samples prepared through artificial fermentation, their protein samples, as well as pollen and beebread butanol and aquatic fractions.

During the laboratory analysis, serial dilutions of the samples were prepared, in order to obtain specific concentrations, and their cytotoxic activity was then tested, through the MTT colorimetric assay. Based on the values obtained by measuring the absorbance at an appropriate wavelength, the CC_{50} value was calculated for each sample. Then, an appropriate amount of MDCK cell culture infected with the H1N1 strain was added to the dilutions of the samples, after which their antiviral activity was tested, through the isolation of viral RNA from the samples, reverse transcription for the synthesis of the complementary cDNA molecule and Real-Time PCR. The IC_{50} value of each sample was calculated from the results of the Real-Time PCR. Finally, after the CC_{50} and IC_{50} values had been calculated, the selectivity index SI was also calculated for each sample, for which the higher the value, the greater the antiviral activity of the sample.

Based on the obtained results, it was concluded that the protein samples showed better antiviral activity against influenza type A virus, compared to the pollen and beebread samples and their fractions. However, larger scale research is required to confirm the above conclusion.

Key words: Beebread, Bee Collected Pollen (BCP), Artificial Fermentation, Protein Samples, Butanol fractions, Aquatic fractions, MDCK cell cultures, Antiviral activity, Influenza type A virus, MTT colorimetric assay, Real-Time PCR, CC_{50} , IC_{50} and SI values.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Τι είναι το μελισσόψωμο	7
1.2	Χημική σύσταση	7
1.3	Μικροβίωμα γύρης και μελισσόψωμου	9
1.4	Ιός της Γρίπης τύπου Α	11
1.4.1	Γενικά.....	11
1.4.2	Ταξινόμηση.....	12
1.4.3	Κύκλος ζωής.....	13
1.5	Θεραπεία έναντι του ιού της Γρίπης τύπου Α.....	15
1.6	Αντιβακτηριακή και αντι-ϊκή δράση γύρης και μελισσόψωμου.....	17
1.6.1	Αντιβακτηριακή δράση.....	17
1.6.2	Αντι-ϊκή δράση	18
2.	ΣΚΟΠΟΣ	19
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1	Δείγματα.....	20
3.2	Παρασκευή και προετοιμασία δειγμάτων	21
3.2.1	Προετοιμασία δειγμάτων γύρης και τεχνητού μελισσόψωμου	21
3.2.2	Παρασκευή πρωτεϊνικών δειγμάτων	21
3.2.3	Προετοιμασία βουτανολικών και υδατικών κλασμάτων.....	22
3.2.4	Διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων	23
3.3	Κυτταροκαλλιέργειες	23
3.4	Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων	24
3.5	Έλεγχος της αντιϊκής δράσης των δειγμάτων	25
3.6	Εκχύλιση ιϊκού RNA	27
3.7	Αντίστροφη μεταγραφή	28
3.8	Real-Time PCR	28
3.9	Υπολογισμός τιμής IC ₅₀ και δείκτη επιλεκτικότητας (Selectivity Index, SI).....	29
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
4.1	Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT και υπολογισμός CC ₅₀	31
4.2	Υπολογισμός IC ₅₀ και δείκτη επιλεκτικότητας SI	32
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι το μελισσόψωμο

Το μελισσόψωμο (beebread, BB) ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των προϊόντων κυψέλης, δηλαδή των προϊόντων που παράγονται από της μέλισσες του είδους *Apis mellifera*. Στην ίδια κατηγορία προϊόντων συναντώνται το μέλι, ο βασιλικός πολτός, η πρόπολη, η γύρη που συλλέγεται από της μέλισσες, το μελισσοκέρι και το δηλητήριο των μελισσών. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα αναφορικά με τη βιοδραστικότητα των προϊόντων κυψέλης και κατ' επέκταση τη χρήση της ως εναλλακτικές θεραπείες (Asoutis-Didaras et al., 2020).

Η διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, δεδομένου ότι αποτελεί το προϊόν ζύμωσης των κόκκων γύρης που συλλέγονται από της μέλισσες (Gilliam M., 1997). Πιο συγκεκριμένα, μια ομάδα μελισσών μεταφέρουν εντός της κυψέλης της κόκκους γύρης και της εναποθέτουν σε ειδικά κελιά. Παράλληλα, άλλη ομάδα μελισσών μεταφέρει στην κυψέλη το νέκταρ των ανθέων και της εκκρίσεις των μελιτογόνων αδένων των εντόμων (μελίτωμα), που αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή μελιού (Ever M. Et al., 2016; Wright G.A et al., 2018). Για τη μεταφορά του νέκταρ και του μελιτώματος είναι απαραίτητη η αποθήκευσή της στον προλοβό του στομάχου των μελισσών και εν συνεχεία η μεταφορά τους σε άλλη ομάδα μελισσών για περαιτέρω επεξεργασία, κατά την οποία εκκρίνονται ένζυμα από της υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών (Ever M. Et al., 2016). Ποσότητα αυτού του νέκταρ, τοποθετείται μαζί με μέλι και διάφορες αδενικές εκκρίσεις στα κελιά με της γυρεόκοκκους. Αφού, λοιπόν, έχει ολοκληρωθεί η προσθήκη των απαραίτητων συστατικών, οι μέλισσες, με τη βοήθεια των κεφαλιών της, σπρώχνουν το μείγμα στο εσωτερικό των κελιών, ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση με στόχο την παραγωγή του μελισσόψωμου (Gilliam M., 1997).

1.2 Χημική σύσταση

Η χημική σύσταση της γύρης που συλλέγεται από της μέλισσες και του μελισσόψωμου σχετίζεται με της βιολογικές, θρεπτικές, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές της ιδιότητες (Margaoan R. Et al., 2014; Velasquez P. Et al., 2017). Εξαρτάται από την βοτανική και γεωγραφική προέλευση, το κλίμα, τον τύπο του εδάφους, την εποχή και τις καιρικές συνθήκες κατά της οποίες γίνεται η συλλογή της γύρης, καθώς και από την απόσταση που χρειάζεται να διανύσουν οι μέλισσες (bee race) (Nogueira C. Et al., 2012; Urcan A. Et al., 2017).

Τόσο η γύρη όσο και το μελισσόψωμο αποτελούν υψηλής θρεπτικής αξίας προϊόντα και για τον λόγο αυτό αξίζει να γίνει αναφορά στην περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και πολυφαινόλες, συστατικά σημαντικά για την ανάπτυξη και επιβίωση των μελισσών, αλλά και για τον ίδιο τον άνθρωπο (Bakour M. Et al., 2019; Isidorov V. Et al., 2009; Kostic A. Z. Et al., 2020; Margaroan R. Et al., 2019).

Παρόλο που και τα δύο αυτά προϊόντα κυψέλης είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, το μελισσόψωμο παρουσιάζει 20% μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες σε σχέση με της γυρεόκοκκους (Nagai T. Et al., 2004), ενώ περιέχει όλα τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα στον άνθρωπο, της γλουταμικό, βαλίνη, αλανίνη, μεθειονίνη κ.α. (Barene I. Et al., 2014). Επιπλέον, διακρίνεται για την παρουσία ενζύμων, της η αμυλάση, η ινβερτάση, διάφορες φωσφατάσες, καθώς και για την παρουσία συμπαραγόντων ενζύμων, της η βιοτίνη, η γλουταθειονή κτλ. (Salazar-Gonzalez C. Et al., 2016).

Ως της την περιεκτικότητά της σε λιπίδια, αποτελούν πολύ καλή πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων (Campos M. G. R. Et al., 2008; Nagai T. Et al., 2004). Ιδιαίτερα στην περίπτωση του μελισσόψωμου, περιέχονται σημαντικές ποσότητες πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων και κυρίως Ω-3 πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία και διατροφή, δεδομένου ότι μειώνουν τα τριγλυκερίδια και τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα (Von Schacky C. Et al., 2007), ενώ παράλληλα παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες (Simopoulos A. P., 1991). Εκτός από την περιεκτικότητά της σε λιπίδια, η γύρη που συλλέγεται από της μέλισσες και το μελισσόψωμο είναι πλούσια σε βιταμίνες, της βιταμίνες του συμπλέγματος B, βιταμίνη A και C (Arruda V. Et al., 2013; Farag S. Et al., 2016), καθώς και σε ιχνοστοιχεία, αφού περιέχουν κάλιο, φώσφορο, σίδηρο κτλ. (Foote H.L, 1957; Haydak M.H., 1958). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι ποσότητες ιχνοστοιχείων που περιέχονται στο μελισσόψωμο είναι μεγαλύτερες από αυτές που περιέχονται στη γύρη, ενώ επιπλέον το μελοσσόψωμο περιέχει και βιταμίνη K που δεν υπάρχει της γυρεόκοκκους (Giliam M., 1979; Haydak M.H et al., 1950).

Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μεταξύ της γύρης και του μελισσόψωμου διαφέρει σημαντικά, με τη γύρη να περιέχει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (Barene I. Et al., 2014; Estevinho L. Et al., 2011; Nagai T. Et al., 2004), χωρίς της αυτό να αποκλείει την παρουσία σακχάρων, της φρουκτόζης και γλυκόζης στο μελισσόψωμο (Herbert E.W. et al., 1978). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μειωμένη ποσότητα υδατανθράκων στο μελισσόψωμο οφείλεται στο μεταβολισμό αυτών από βακτήρια του γένους *Lactobacillus* spp. Της

παραγωγή γαλακτικού οξέος, στα πλαίσια της ζύμωσης των γυρεόκοκκων (Barene I. Et al., 2014; Fuenmayor C. Et al., 2014; Herbert E.W. et al., 1978).

Τόσο η γύρη όσο και το μελισσόψωμο είναι πλούσια και σε πολυφαινόλες. Πρόκειται για οργανικά συστατικά που προσδίδουν της κόκκους της γύρης το χαρακτηριστικό της χρώμα (Zuluaga C. Et al., 2016), παρουσιάζοντας παράλληλα και σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Markiewicz-Zukowska R. Et al., 2013; Sharma A. Et al., 2018; Sobral F. Et al., 2017). Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στη γύρη και το μελισσόψωμο ταξινομούνται χημικά ως флаβονοειδή και φαινολικά οξέα (Urcan A. Et al., 2017). Στην περίπτωση των флаβονοειδών, η ναριγγενίνη (naringenin), καμφερόλη (kaempferol), απιγενίνη (apigenin) και κερκετίνη (quercetin) είναι αυτές που εντοπίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες, ενώ το π-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid) αποτελεί το κυριότερο φαινολικό οξύ (Isidorov V. Et al., 2009). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά που αναφέρθηκαν, έρευνα έχει δείξει ότι μεταξύ των δύο προϊόντων κυψέλης δεν παρουσιάζονται διαφορές ως της την περιεκτικότητά της σε πολυφαινόλες, παρόλες της βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ζύμωση της γύρης σε μελισσόψωμο (Urcan A. Et al., 2018).

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως η γύρη και το μελισσόψωμο παρουσιάζουν διαφορές της ποσότητας των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν (Urcan A. Et al., 2017). Στην περίπτωση των γυρεόκοκκων, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες περιβάλλονται από δύο στρώματα, ένα εξωτερικό που αποτελείται από ένα σκληρό βιοπολυμερές, τη σποροπολλενίνη και ένα εσωτερικό που αποτελείται από ελαστική κυτταρίνη, μικροϊνίδια και πηκτίνη (Fan T. F. Et al., 2020). Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, τα δυο αυτά στρώματα διασπώνται με τη βοήθεια ενζύμων που παράγονται τόσο από της της μέλισσες, όσο και από μικροοργανισμούς, της βακτήρια και μύκητες. Έτσι, τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται από το εσωτερικό των γυρεόκοκκων και εμπλουτίζουν το τελικό προϊόν της ζύμωσης, το μελισσόψωμο (Cremonez T.M. et al., 1998; Hagedorn H.H. et al., 1968).

1.3 Μικροβίωμα γύρης και μελισσόψωμου

Της αναφέρεται στην ενότητα 1.1, η παραγωγή του μελισσόψωμου είναι το αποτέλεσμα της ζύμωσης των κόκκων της γύρης που συλλέγεται από της μέλισσες (Gilliam M., 1997). Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, είναι απαραίτητη η παρουσία βακτηρίων που ενοφθαλμίζονται από τη μέλισσα *Apis mellifera* της κόκκους γύρης μέσω του προλοβού της

(Martinson V.G. et al., 2011), καθώς και βακτηρίων που προέρχονται τόσο από τα φυτά όσο και από το περιβάλλον της κυψέλης (Anderson K.E. et al., 2014).

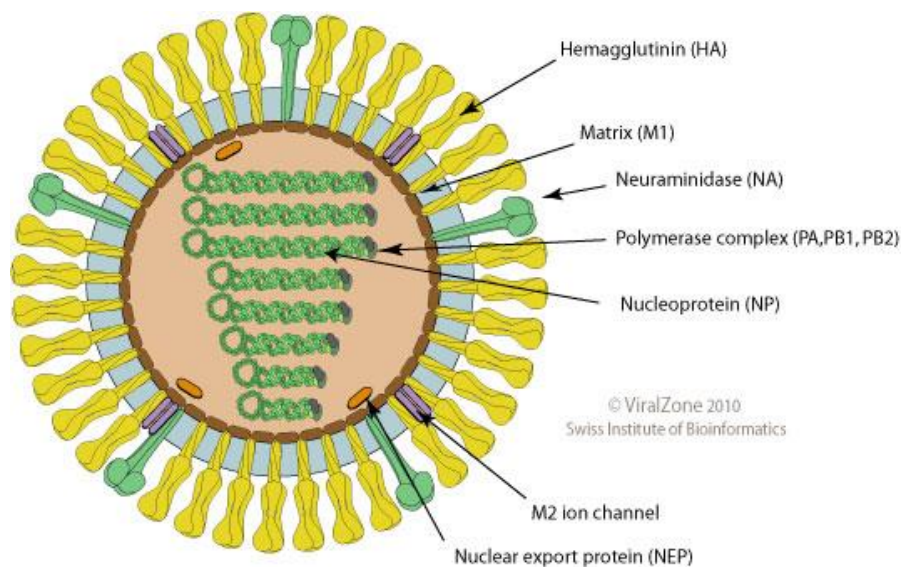
Όσον αφορά στο μικροβίωμα του πεπτικού συστήματος των μελισσών, αυτό αποτελείται από 9 διακριτά βακτηριακά φύλα (Cox-Foster D.L. et al., 2007; Jeyaprakash A. Et al., 2003; Martinson V.G. et al., 2011; Olofsson T.C. et al., 2008), τα οποία εμπλέκονται τόσο στην πέψη των κόκκων της γύρης και την παραγωγή ουσιών που συμβάλλουν στην διατήρηση του μελισσόψωμου, όσο και στην ανοσοαπόκριση των μελισσών (Killer J et al., 2014; Vasquez A. Et al., 2012). Μεταξύ των διαφορετικών ειδών βακτηρίων που εντοπίζονται στο μικροβίωμα του πεπτικού συστήματος των μελισσών, σημαντικό ρόλο παίζουν τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ (Lactic Acid Bacteria, LABs) (Vasquez A. Et al., 2009). Η κοινότητα αυτών των βακτηρίων περιλαμβάνει 12 είδη, που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Olofsson T.C. et al., 2008), και θεωρείται ως η πρωταρχική καλλιέργεια βακτηρίων που ενοφθαλμίζεται μέσω των εκκρίσεων των αδένων των μελισσών, ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση της γύρης της παραγωγή μελισσόψωμου (Vasquez A. Et al., 2009).

Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου αποτελείται κυρίως από της μέλη τόσο της οικογένειας *Lactobacillaceae* όσο και της *Enterobacteriaceae*. Σε αυτά εντοπίζονται τα γένη *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Bifidobacterium*, καθώς και τα *Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* και *Serratia* αντίστοιχα (Mattila H.R. et al., 2012). Αρκετά από τα είδη που ανήκουν στα γένη αυτά αποτελούν μέλη και του εντερικού μικροβιώματος των μελισσών, χωρίς της αυτό να αποκλείει την παρουσία μοναδικών βακτηριακών αλληλουχιών, της αυτών των *Bradyrhizobiaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Rhodobacterales*, *Pseudomonadales*, *Bacteroidetes* και πολλών ομάδων *Actinobacteria* (Anderson K.E. et al., 2014). Από τα παραπάνω, αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η σύνθεση του μικροβιώματος του μελισσόψωμου περιλαμβάνει τόσο δυνητικά όσο και υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, γεγονός που δείχνει ότι η ζύμωση των κόκκων της γύρης γίνεται κάτω από μια διαβαθμισμένη πίεση οξυγόνου, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών (Mattila H.R. et al., 2012).

1.4 Ιός της Γρίπης τύπου A

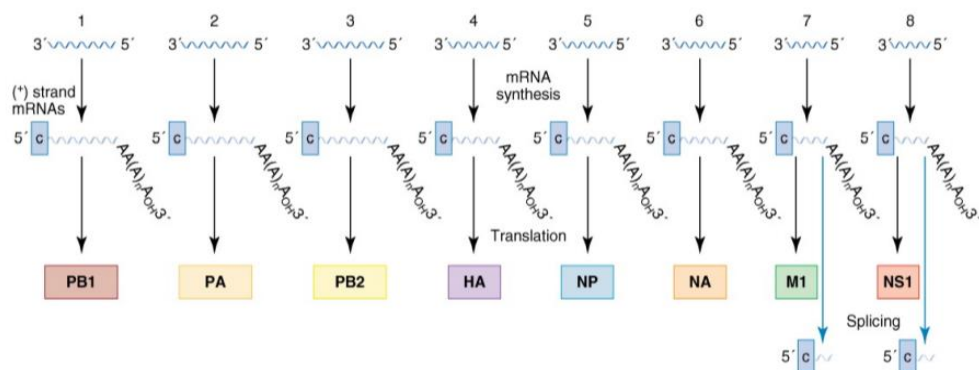
1.4.1 Γενικά

Ο ιός της γρίπης τύπου A περιέχει οκτώ τεμάχια μονόκλωνου RNA αρνητικής πολικότητας (-ssRNA), μήκους 934 έως 2.341 νουκλεοτιδίων. Τα ιϊκά σωμάτια, διαμέτρου 80 – 120nm, παρουσιάζουν ελικοειδή συμμετρία και περιβάλλονται από εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα (φάκελο). Στην εξωτερική επιφάνεια του ιού εντοπίζονται διαμεμβρανικοί ιοντικοί δίαυλοι M2, ενώ εδράζονται και 500 περίπου γλυκοπρωτεΐνες με μορφή ακίδας, οι οποίες προεξέχουν από το ιϊκό σωμάτιο. Οι κυριότερες γλυκοπρωτεΐνες του ιού είναι η αιμοσυγκολλητίνη (HA) και η νευραμινιδάση (NA). Στο εσωτερικό του ιϊκού σωματίου εντοπίζονται αντίγραφα πρωτεϊνών πυρηνικής εξαγωγής (NS2), καθώς και οι πρωτεΐνες της μήτρας 1 (M1), οι οποίες σχηματίζουν ένα στρώμα που περιβάλλει τα οκτώ τεμάχια του ιϊκού γονιδιώματος. Καθένα από αυτά τα μονόκλωνα RNA τεμάχια αρνητικής πολικότητας επικαλύπτεται με νουκλεοπρωτεΐνες (NP), ενώ επιπλέον στα άκρα τους εντοπίζεται ένα σύμπλοκο RNA-εξαρτώμενης RNA-πολυμεράσης, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες PB1, PB2 και PA (Shors T., 2017).



Εικόνα 1.4.1.1: Δομή του ιού της Γρίπης τύπου A. Hulo C. et al. *ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity*. Nucleic Acids Res. January 2011.

Συνολικά, τα τεμάχια RNA του ιού κωδικοποιούν για 10 πρωτεΐνες. Τα μόρια RNA που μεταγράφονται από τα τεμάχια 1-6 κωδικοποιούν το καθένα από μία πρωτεΐνη, ενώ αυτά που μεταγράφονται από τα τεμάχια 7 και 8 υφίστανται μάτισμα και κωδικοποιούν για περισσότερες από μία πρωτεΐνες (Shors T., 2017).



Εικόνα 1.4.1.2: Διαδικασία κωδικοποίησης κάθε τμήματος -ssRNA. Flint S. et al. *Principals of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*, 2nd Ed. ASM Press, 2003.

1.4.2 Ταξινόμηση

Οι ιοί της γρίπης ανήκουν στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* και ταξινομούνται σε τρία γένη, τον ιό της γρίπης τύπου Α, τύπου Β και τύπου C. Οι τρεις αυτοί τύποι παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές ως προς το γονιδίωμα, τη δομή του ιϊκού σωματίου, το εύρος των ξενιστών, τον μηχανισμό μέσω τον οποίο επιτυγχάνεται η γενετική της ποικιλότητα και την κλινική εικόνα των ασθενών (Shors T., 2017). Οι διαφορές αυτές συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.4.2.1: Διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τύπων ιών της γρίπης. Shors T., *Influenza Viruses, Understanding Viruses*: Chapter 9 (391-448).

Χαρακτηριστικά	Ιός της γρίπης Α	Ιός της γρίπης Β	Ιός της γρίπης C
Εύρος ξενιστών	Άνθρωποι, χοίροι, άλογα, πτηνά, θαλάσσια θηλαστικά	Μόνο άνθρωποι	Άνθρωποι και χοίροι
Επιδημιολογία	Αντιγονική ολίσθηση και μετατόπιση	Μόνο αντιγονική ολίσθηση	Μόνο αντιγονική ολίσθηση
Κλινικά χαρακτηριστικά	Μπορεί να προκαλέσει πανδημίες με σημαντικά ποσοστά θνητότητας σε άτομα νεαρής ηλικίας	Σοβαρή νόσος, γενικά περιορίζεται σε γηραιότερα ή άτομα υψηλού κινδύνου. Δεν έχουν εντοπιστεί πανδημίες	Ήπια νόσος, συχνή σε παιδιά, χωρίς εποχική κατανομή
Γονιδίωμα	8 τεμάχια	8 τεμάχια	7 τεμάχια
Δομή	10 ιϊκές πρωτεΐνες, μοναδική M2	11 ιϊκές πρωτεΐνες, μοναδική NB	9 ιϊκές πρωτεΐνες, μοναδική HEF

Στην περίπτωση των ιών της γρίπης τύπου Α διακρίνονται διαφορετικοί υπότυποι, οι οποίοι ταξινομούνται με βάση της αντιγονικές ιδιότητες της αιμοσυγκολλητίνης (HA) και της

νευραμινιδάσης (NA), δηλαδή των γλυκοπρωτεϊνών που συναντώνται στην επιφάνεια του περιβλήματος του ιού. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 18 υπότυποι HA και 11 υπότυποι NA (Eisfeld A. Et al., 2014). Ο συνδυασμός αυτών των διαφορετικών υποτύπων οδηγεί στη δημιουργία διαφορετικών στελεχών που εντοπίζονται σε διαφορετικό είδος ξενιστή. Κι ενώ όλοι οι υπότυποι HA και NA έχουν αναγνωρισθεί στα πτηνά, τα στελέχη H1N1, H3N2 και H5N1 έχουν προσβάλλει τον άνθρωπο και είναι υπεύθυνα για επιδημίες που χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό θνησιμότητας (WHO, 2014). Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι είναι απαραίτητη η ανίχνευση των διαφορετικών υποτύπων ιών της γρίπης τύπου A στα διαφορετικά είδη ξενιστών με στόχο την αποτροπή επιδημιών ή ακόμα και πανδημιών (Eisfeld A. Et al., 2014).

1.4.3 Κύκλος ζωής

- Πρόσδεση και Είσοδος του ιού

Η αιμοσυγκολλητίνη (H) του ιού της γρίπης τύπου A προσκολλάται σε κατάλοιπα σιαλικού οξέος των γλυκοπρωτεϊνών ή γλυκολιπιδίων των κυττάρων του κροσσωτού επιθηλίου των αεραγωγών και της ρινικής κοιλότητας του ξενιστή. Τα ιϊκά σωματίδια εισέρχονται με ενδοκύτωση στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. Το εσωτερικό του ενδοσώματος χαρακτηρίζεται από χαμηλό pH, γεγονός που επιτρέπει τη σύντηξη της λιπιδικής μεμβράνης που περιβάλλει το καψίδιο του ιού με τη μεμβράνη του ενδοσώματος (Das K. Et al., 2010).

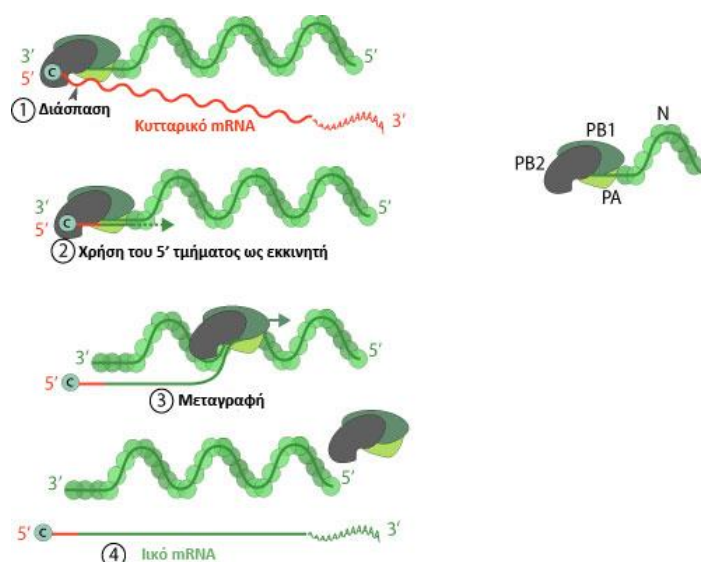
- Απέκδυση

Μετά τη σύντηξη με της λιπιδικής μεμβράνης του ιού με τη μεμβράνη του ενδοσώματος, ο διαμεμβρανικός ιοντικός διάλυος M2, που εντοπίζεται στα ιϊκά σωματίδια, επιτρέπει στα ιόντα H⁺ να διεισδύσουν στο καψίδιο, με αποτέλεσμα να εξασθενεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης μήτρας M1 με τις νουκλεοπρωτεΐνες NP και το σύμπλοκο της RNA-εξαρτώμενης RNA-πολυμεράσης, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν το σύμπλοκο RNP, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα (Das K. Et al., 2010).

- Σύνθεση του ιϊκού mRNA και αντιγραφή

Την είσοδο του συμπλόκου RNP στον πυρήνα ακολουθεί η σύνθεση του mRNA του ιού, κατά την οποία πραγματοποιείται μια διαδικασία που ονομάζεται αρπαγή καλύμματος (cap-snatching). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη PB2 του συμπλόκου RNP συνδέεται με την 5'-καλύπτρα των μορίων mRNA του ξενιστή που εντοπίζονται στον πυρήνα. Κατόπιν, η 5'-καλύπτρα μαζί με 10-13 νουκλεοτίδια καθοδικά της απομακρύνονται και χρησιμοποιούνται

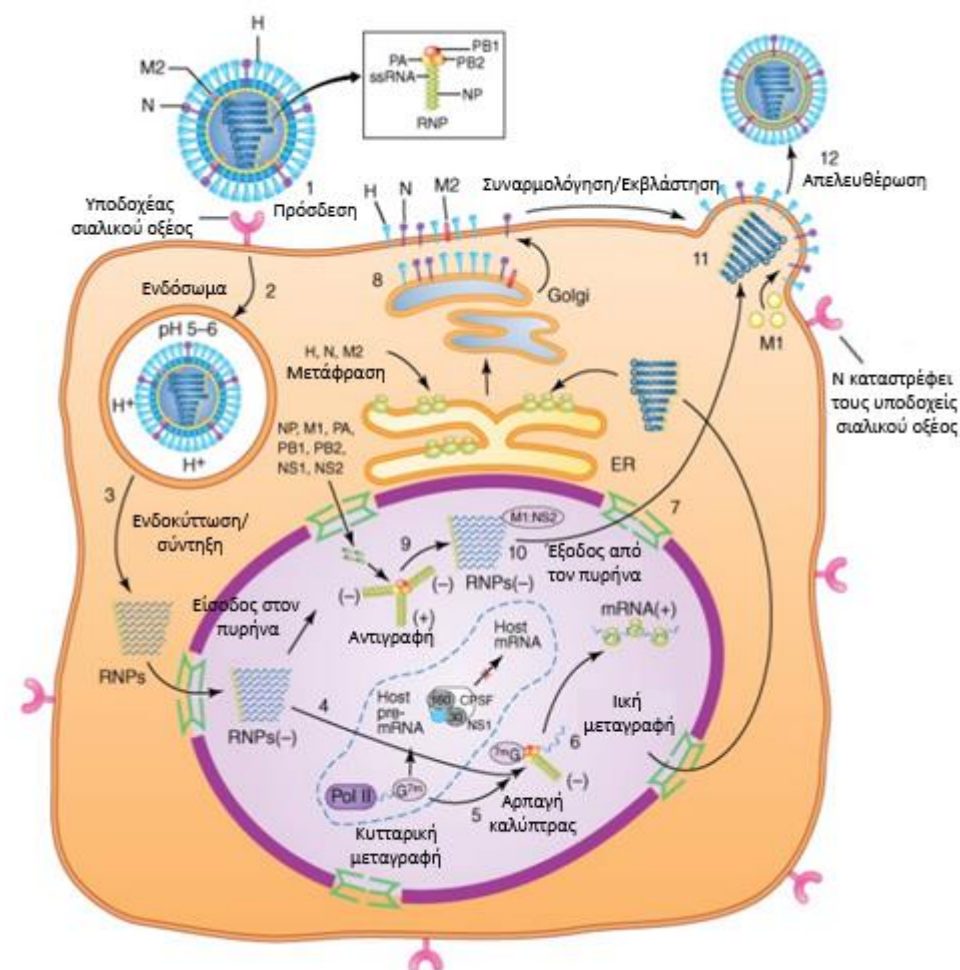
ως εκκινήτης από τις πρωτεΐνες PB1 και PA του συμπλόκου RNP για την έναρξη της μεταγραφής καθενός από τα οκτώ τμήματα RNA του ιού. Τα έξι ιϊκά mRNAs εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, όπου και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα του ξενιστή, ενώ τα υπόλοιπα δύο υφίστανται μάτισμα, μέσω της μηχανής μάτισματος του ξενιστή, παράγοντας δύο τουλάχιστον διαφορετικά μόρια mRNA (Das K. Et al., 2010).



Εικόνα 1.4.3.1: Η διαδικασία σύνθεσης του ιϊκού mRNA, μέσω της αρπαγής καλύπτρας. Πηγή με τροποποίηση: ViralZone.

- Ωρίμανση, Συναρμολόγηση και Απελευθέρωση των ιϊκών σωματίων

Τα έξι ιϊκά mRNAs που εξάγονται στο κυτταρόπλασμα μεταφράζονται από ριβοσώματα που είναι σε μεμβράνες, οπότε και συντίθενται οι πρωτεΐνες αιμοσυγκολλητίνη (H), νευραμινιδάση (N) και M2. Κατόπιν, εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου αναδιπλώνονται και γλυκοζυλιώνονται, ενώ στη συνέχεια μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi και τελικά στην κυτταρική επιφάνεια, όπου και πραγματοποιείται η συναρμολόγηση. Κατά τη συναρμολόγηση, σε κάθε νέο ιϊκό σωματίο θα πρέπει να εισέρχεται τουλάχιστον ένα αντίγραφο από κάθε τεμάχιο RNA, προκειμένου να καταστεί μολυσματικό. Αφού συναρμολογηθούν, τα ιϊκά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο-ξενιστή με εκβλάστηση. Πιο συγκεκριμένα, κατά την έξοδο του ιού, η νευραμινιδάση (N) καταστρέφει της υποδοχείς σιαλικού οξέος των κυττάρων, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη συσσώρευση των νεοσυντιθέμενων ιών στην κυτταρική επιφάνεια και διευκολύνοντας την απελευθέρωσή της (Das K., et al., 2010).



Εικόνα 1.4.3.1: Στάδια του κύκλου ζωής του ιού της Γρίπης τύπου A.
Das K. et al. *Structures of Influenza A proteins and insights into antiviral drug targets*. Nat Struct Mol Bio 2010, 17(5): 530-538, με τροποποιήσεις.

1.5 Θεραπεία έναντι του ιού της Γρίπης τύπου A

• Αντι-ϊικά Φάρμακα

Η χρήση αντι-ϊικών φαρμάκων έχει ως στόχο την αναστολή του κύκλου ζωής του ιού. Έχουν αναπτυχθεί δυο τύποι τέτοιων φαρμάκων: οι M2 αναστολείς και οι αναστολείς της νευραμινιδάσης (N αναστολείς) (Monto A., 2003; Moscona A., 2005).

Οι M2 αναστολείς είναι τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν έναντι του ιού της γρίπης τύπου A. Μπλοκάρουν τους ιοντικούς διαύλους M2 που εντοπίζονται στην επιφάνεια των ιικών σωματίων, εμποδίζοντας έτσι την απέκδυση του ιού και κατ' επέκταση τα υπόλοιπα στάδια του κύκλου ζωής του. Ωστόσο, η χρήση τους παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Θα πρέπει να λαμβάνονται εντός 48 ωρών από τη στιγμή της μόλυνσης ή ακόμα και προληπτικά, ενώ είναι αποτελεσματικοί σε ποσοστό 70-90% στην πρόληψη των

μολύνσεων από τον ιό. Δύο είναι οι M2 αναστολείς που έχουν αναπτυχθεί, η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη, οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι ως Symmetrel και Flumadine αντίστοιχα. Κανένας από τους εν λόγω αναστολείς, όμως, δεν χρησιμοποιείται έναντι των κυκλοφορούντων ιών της γρίπης τύπου A, καθώς αυτοί έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα, καθιστώντας τους έτσι αναποτελεσματικούς (Monto A., 2003; Moscona A., 2005).

Οι αναστολείς της νευραμινιδάσης αναστέλλουν τη νευραμινιδάση, που είναι υπεύθυνη για την καταστροφή των υποδοχέων σιαλικού οξέος στην επιφάνεια των κυττάρων-ξενιστών. Πρόκειται για ανάλογα σιαλικού οξέος που μπλοκάρουν το ενεργό κέντρο της νευραμινιδάσης, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της. Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των M2 αναστολέων, έτσι και η χρήση των N αναστολέων συνοδεύεται από ορισμένα μειονεκτήματα. Η χορήγησή τους θα πρέπει να γίνεται μέσα σε 48 ώρες από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων για να είναι αποτελεσματικοί, ενώ συχνά προκαλούν παρενέργειες στους ασθενείς. Ως N αναστολείς χρησιμοποιούνται η φωσφορική οσελταμιβίρη, η ζαναμιβίρη και η περαμιβίρη, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες ως Tamiflu, Relenza και Rapinab και χορηγούνται με τη μορφή χαπιού, ως εισπνεόμενο και ενδοφλέβια αντίστοιχα (Monto A., 2003; Moscona A., 2005).

- Εμβόλια

Ο εμβολιασμός αποτελεί την πλέον αποτελεσματική μέθοδο πρόληψης των μολύνσεων από τον ιό της γρίπης τύπου A. Έως τώρα από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) έχουν εγκριθεί τρεις διαφορετικοί τύποι εμβολίων. Από αυτούς, ο ένας διατίθεται σε μορφή ρινικού εκνεφώματος, περιλαμβάνει ζωντανούς, εξασθενημένους ιούς της γρίπης τύπου A και B και η παραγωγή του γίνεται σε γονιμοποιημένα αυγά κότας. Όσον αφορά στους άλλους δύο τύπους, πρόκειται είτε για ανασυνδυασμένα εμβόλια κατασκευασμένα από καθαρισμένη πρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνης από καλλιέργεια εντόμων, είτε για ανενεργά εμβόλια που παράγονται σε καλλιέργειες κυττάρων από νεφρά σκύλου (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK), δηλαδή κυττάρων που διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνειά τους, ώστε να είναι δυνατή η έναρξη του κύκλου ζωής του ιού (Shors T., 2017).

Η σύσταση των εμβολίων βασίζεται σε προβλέψεις σχετικά με τα στελέχη του ιού της γρίπης τύπου A που θα κυκλοφορούν κατά την περίοδο της εποχιακής γρίπης στις Η.Π.Α, ενώ η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την ηλικία του ατόμου που εμβολιάζεται, την κατάσταση του ανοσοποιητικού του συστήματος, καθώς και από το ποσοστό ομοιότητας

μεταξύ των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύστασή τους αλλά και των κυκλοφορούντων στελεχών (Shors T., 2017).

1.6 Αντιβακτηριακή και αντι-ϊική δράση γύρης και μελισσόψωμου

1.6.1 Αντιβακτηριακή δράση

Τα τελευταία χρόνια η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών και στην επακόλουθη ανάγκη για ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισής τους (Graikou K. et al., 2011; Morais M. et al., 2011, Abouda Z. et al., 2011). Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.1, ολοένα και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον παρατηρείται σχετικά με τις αντιβακτηριακές ιδιότητες της γύρης και του μελισσόψωμου (Asoutis Didaras et al., 2020). Αν και μέχρι σήμερα έχει διεξαχθεί ένας περιορισμένος αριθμός ερευνών, έχει δειχθεί ότι η αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων προϊόντων κυψέλης εξαρτάται τόσο από τη γεωγραφική και βοτανική τους προέλευση, οι οποίες επηρεάζουν και τη χημική τους σύσταση όσο και από τον τρόπο με το οποίο απομονώνονται τα επιμέρους συστατικά τους για τον εντοπισμό εκείνου που είναι υπεύθυνο για την αναστολή της ανάπτυξης διαφορετικών ειδών βακτηρίων και μυκήτων (Asoutis Didaras et al., 2020).

Η μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης πραγματοποιείται μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration - MIC), που ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή MIC μιας ουσίας, τόσο λιγότερη είναι η ποσότητα αυτής που απαιτείται για να αναστείλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, και άρα τόσο μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός για την εν λόγω ουσία (Asoutis Didaras et al., 2020). Από τις έρευνες που έχουν διεξαχθεί φαίνεται ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στη γύρη και στο μελισσόψωμο σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ενώ ποικίλλει η ευαισθησία που παρουσιάζουν οι δυο αυτές ομάδες βακτηρίων στους διαφορετικούς τύπους διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της κλασμάτωσης (Bridi R. et al., 2019; Pascoal A. et al., 2014; Karadal F. et al., 2018; Urcan A. et al., 2018).

Είναι σημαντικό, ακόμα, να αναφερθεί ότι η αντιβακτηριακή δράση των συγκεκριμένων προϊόντων κυψέλης αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, χωρίς να διαταράσσει τις κοινότητες μικροβίων που είναι ωφέλιμες για τον ξενιστή (Khider

M. et al., 2013; Jaisinghani R. et al., 2017; Wang S. et al., 2018). Ωστόσο, απαιτούνται μεγαλύτερης κλίμακας έρευνες με στόχο την αξιόπιστη αξιολόγηση του εν λόγω συμπεράσματος.

1.6.2 Αντι-ιϊκή δράση

Σε αντίθεση με την πληθώρα ερευνών που έχει διεξαχθεί αναφορικά με τις αντιβακτηριακές ιδιότητες της γύρης και του μελισσόψωμου (Abouda Z. et al., 2011; Bakour M. et al., 2017), η επιβεβαίωση της ύπαρξης αντι-ιϊκής δράσης ήρθε για πρώτη φορά στο φως, ύστερα από τη χρήση τους έναντι του εντροϊού D68 (EV-D68) (Asoutis-Didaras N. et al., 2021). Η συγκεκριμένη έρευνα, που πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα Rd, απέδειξε ότι τόσο η γύρη όσο και το μελισσόψωμο αναστέλλουν τον ιό EV-D68 και μάλιστα σε συγκεντρώσεις που δεν είναι τοξικές για τα ίδια τα κύτταρα.

Επιπλέον, στα πλαίσια εργαστηριακής μελέτης που διεξήχθη στην Κορέα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δυνατότητας που έχουν ορισμένα από τα φλαβονοειδή που περιέχονται στη γύρη να αναστέλλουν τη δράση της νευραμινιδάσης συγκεκριμένων στελεχών του ιού της γρίπης. Φλαβονοειδή, όπως kaempferol-3-sophoroside, kaempferol-3-neohesperidoside, kaempferol-3-sambubioside, kaempferol-3-glucoside, quercetin-3-sophoroside, luteolin and chelanthifoline ανέστειλαν τη λειτουργία της συγκεκριμένης γλυκοπρωτεΐνης και παρουσιάζοντας ισχυρή αντιϊκή δράση έναντι των στελεχών H1N1, H3N2 και H5N1 (Lee I.K. et al., 2016).

Τέλος, από έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που νοσούσαν από COVID-19, έγινε φανερό ότι η ανάρρωση των ασθενών που έλαβαν ως θεραπεία γύρη και μελισσόψωμο ήταν ταχύτερη σε σχέση με εκείνους που ακολουθούσαν φαρμακευτική αγωγή, γεγονός που επιβεβαιώθηκε τόσο από την θεραπεία των συμπτωμάτων τους όσο και από τα επίπεδα O₂ στο αίμα τους, έπειτα από τη διεξαγωγή βιοχημικών εξετάσεων (Abedini A. et al., 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος της αντι-ϊκής δράσης δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου, καθώς και κλασμάτων αυτών έναντι του ιού της γρίπης τύπου Α. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου είχε αποδειχθεί η αντι-ϊκή δράση ενός δείγματος γύρης και δύο δειγμάτων μελισσόψωμου έναντι του στελέχους H1N1. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν βουτανολικά και υδατικά κλάσματα των παραπάνω δειγμάτων, αλλά και νέα δείγματα που προέκυψαν έπειτα από μια διαδικασία τεχνητής ζύμωσης δείγματος γύρης.

Για τον λόγο αυτό σε καλλιέργεια κυττάρων MDCK μολυσμένη με τον ιό της γρίπης τύπου Α, προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε δείγματος, ώστε μέσω της τεχνικής Real-Time PCR να βρεθεί η συγκέντρωση εκείνη στην οποία παρατηρείται μείωση του ιϊκού τίτλου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα

Για τη διεξαγωγή της εργαστηριακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 2 δείγματα γύρης (AF1 και BB6) και 2 δείγματα μελισσόψωμου (BB1 και BB4). Από τα παραπάνω δείγματα και έπειτα από την επεξεργασία τους, προέκυψαν τελικά 13 δείγματα: 4 δείγματα γύρης, 3 δείγματα μελισσόψωμου και 6 δείγματα μελισσόψωμου που προέκυψαν έπειτα από τεχνητή ζύμωση δείγματος γύρης. Η τεχνητή ζύμωση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Μοριακής Βακτηριολογίας - Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του διδακτορικού του υποψήφιου διδάκτορα Ασούτη-Διδάρα Νικόλαου.

Πίνακας 3.1: Περιγραφή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας εργαστηριακής μελέτης, με διακεκομμένη γραμμή παρατίθενται τα δείγματα της προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου.

Δείγμα	Τύπος δείγματος	Περιγραφή
AF1	Γύρη	Πολυανθική γύρη έτους 2022
AF4	Τεχνητό μελισσόψωμο	Μελισσόψωμο από τεχνητή ζύμωση
AF5	Τεχνητό μελισσόψωμο	Μελισσόψωμο από τεχνητή ζύμωση
AF17	Τεχνητό μελισσόψωμο	Μελισσόψωμο από τεχνητή ζύμωση
AF1-P	Γύρη	Πρωτεϊνικό κλάσμα δείγματος AF1
AF4-P	Τεχνητό μελισσόψωμο	Πρωτεϊνικό κλάσμα δείγματος AF4
AF5-P	Τεχνητό μελισσόψωμο	Πρωτεϊνικό κλάσμα δείγματος AF5
AF17-P	Τεχνητό μελισσόψωμο	Πρωτεϊνικό κλάσμα δείγματος AF17
BB1	Μελισσόψωμο	Πολυανθικό μελισσόψωμο έτους 2019
BB4	Μελισσόψωμο	Πολυανθικό μελισσόψωμο έτους 2019
BB6	Γύρη	Πολυανθική γύρη έτους 2019
BB1-B	Μελισσόψωμο	Βουτανολικό κλάσμα δείγματος BB1
BB4-B	Μελισσόψωμο	Βουτανολικό κλάσμα δείγματος BB4
BB6-B	Γύρη	Βουτανολικό κλάσμα δείγματος BB6
BB4-H	Μελισσόψωμο	Υδατικό κλάσμα δείγματος BB4
BB6-H	Γύρη	Υδατικό κλάσμα δείγματος BB6

3.2 Παρασκευή και προετοιμασία δειγμάτων

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων γύρης και τεχνητού μελισσόψωμου

Για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, αρχικά ζυγίστηκαν 100mg από τα δείγματα AF1, AF4, AF5 και AF17 και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 2ml, στον οποίο προστέθηκαν 950μl θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιιεργειών Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Biosera, France). Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 20°C, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκαν ισχυρές αναδεύσεις (vortex), με στόχο την πλήρη διαλυτοποίηση των δειγμάτων. Μετά το πέρας της απαιτούμενης ώρας, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στα 10.000 rcf. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε και φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια φίλτρων διαμέτρου 0,22μm, με στόχο την απομάκρυνση τυχόν μη διαλυτοποιημένων σωματιδίων γύρης και μελισσόψωμου ή ακόμα και βακτηρίων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν αιτία επιμόλυνσης της κυτταροκαλλιιεργείας.

3.2.2 Παρασκευή πρωτεϊνικών δειγμάτων

Για την παρασκευή των πρωτεϊνικών δειγμάτων του Πίνακα 3.1 ζυγίστηκαν 500mg από τα δείγματα AF1, AF4, AF5 και AF17 και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 2ml, στον οποίο προστέθηκε 1,5ml δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 20°C, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκαν ισχυρές αναδεύσεις (vortex), με στόχο την πλήρη διαλυτοποίηση των δειγμάτων. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 10.000 rcf. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα 2ml, στον οποίο, επιπλέον, προστέθηκαν 0,67g θειικού αμμωνίου [(NH₄)₂SO₄]. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση για 10 λεπτά στους -20°C, προκειμένου να διαλυθεί πλήρως το NH₄SO₃. Την επώαση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στα 11.000 rcf, μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα, στο οποίο περιέχονταν οι πρωτεΐνες, επαναδιαλύθηκε σε 1ml ddH₂O.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το θειικό αμμώνιο χρησιμοποιείται ώστε να συμβάλλει στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης, κατά το οποίο τα ιόντα άλατος αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού, μειώνοντας έτσι τα διαθέσιμα μόρια νερού που σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις με τα υδρόφιλα μόρια των πρωτεϊνών, οδηγώντας έτσι στην κατακρήμνιση αυτών.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκε προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε 1ml ddH₂O και το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control) σε επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας.

3.2.3 Προετοιμασία βουτανολικών και υδατικών κλασμάτων

Η αρχική παρασκευή των κλασμάτων των δειγμάτων BB1, BB4 και BB6 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την προετοιμασία των κλασμάτων προστέθηκαν 2ml MEM σε καθένα από τα δοχεία στα οποία περιέχονταν τα αρχικά κλάσματα σε λυόφιλη μορφή. Με τη βοήθεια πιπέτας πραγματοποιήθηκε ανάδευση του διαλύματος και στη συνέχεια αυτό τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα 2ml.

Η αρχική συγκέντρωση των κλασμάτων δεν ήταν γνωστή. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της ήταν απαραίτητος για την περαιτέρω διεξαγωγή της εργαστηριακής μελέτης. Για τον λόγο αυτό, τα δείγματα ζυγίστηκαν κατά την παραλαβή τους μαζί με τα δοχεία στα οποία περιέχονταν. Μετά την προσθήκη των 2ml MEM προς δημιουργία των δειγμάτων που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο, τα δοχεία στα οποία περιέχονταν αρχικά τα κλάσματα σε αποξηραμένη μορφή, αφέθηκαν με ανοιχτό καπάκι, ώστε να στεγνώσουν και να υποβληθούν εκ νέου σε ζύγιση. Από την διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων, προέκυψε τελικά η αρχική συγκέντρωση των κλασμάτων. Τα αποτελέσματα των ζυγίσεων, καθώς και η συγκεντρώσεις των κλασμάτων φαίνονται στον Πίνακα 3.2.3.1, όπου ως 1^η ζύγιση αναφέρεται η αρχική ζύγιση των κλασμάτων στην αποξηραμένη τους μορφή, ενώ ως 2^η ζύγιση αναφέρεται αυτή που πραγματοποιήθηκε μετά την προσθήκη των 2ml MEM.

Πίνακας 3.2.3.1: Τα αποτελέσματα των ζυγίσεων που πραγματοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων

Δείγματα	1 ^η Ζύγιση (g)	2 ^η Ζύγιση (g)	Συγκέντρωση (mg/ml)
BB1-B	19,478	19,431	23,5
BB4-B	7,754	7,740	7
BB6-B	7,820	7,798	11
BB4-H	21,514	21,252	131
BB6-H	21,340	21,092	124

3.2.4 Διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων

Επόμενο βήμα μετά την προετοιμασία των δειγμάτων του Πίνακα 3.1, ήταν η παρασκευή επιμέρους διαδοχικών αραιώσεων σε θρεπτικό υλικό MEM, με σκοπό τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας και της αντι-ϊικής δράσης. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 8 υποδιπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις για κάθε δείγμα, ξεκινώντας με τη συγκέντρωση 16mg/ml για τα ολικά δείγματα γύρης και μελισσόψωμου, 64mg/ml για τα πρωτεϊνικά δείγματα γύρης και μελισσόψωμου, ενώ στα βουτανολικά και υδατικά κλάσματα η αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων αποτέλεσε και την πρώτη αραιώση.

3.3 Κυτταροκαλλιέργειες

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης των δειγμάτων του Πίνακα 3.1, καθώς και για την καλλιέργεια του ιού της γρίπης τύπου Α χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά MDCK (Madin-Darby Canine Kidney).

Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μέσο ανάπτυξης (Growth Medium, GM), το οποίο διακρίνεται από υψηλή περιεκτικότητα σε βόειο ορό (10% FBS), με στόχο τη γρήγορη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εκτός από βόειο ορό, το συγκεκριμένο μέσο ανάπτυξης περιείχε MEM, 1X Antibiotic-Antimycotic (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και αμφοτερικίνη B) (Biosera, France) και 1X Non-essential amino acids (Biosera, France).

Τα κύτταρα εξετάζονταν σε καθημερινή βάση μέσω παρατήρησης σε ανάστροφο μικροσκόπιο διέλευσης φωτός, ώστε να γίνει έλεγχος τόσο της ποιότητάς τους όσο και της κάλυψης της επιφάνειας της πλαστικής φιάλης κυτταροκαλλιεργειών (φλάσκα κυττάρων). Όταν η επιφάνεια της φλάσκας ήταν καλυμμένη σε ποσοστό 90%, πραγματοποιούνταν ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων, διαδικασία κατά την οποία, αρχικά, απομακρυνόταν το θρεπτικό μέσο, και ακολουθούσαν δύο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Trypsin-EDTA, Biosera, France) και επώαση για 5 λεπτά στους 37°C, με στόχο την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Κατόπιν, στα αποκολλημένα πλέον κύτταρα πραγματοποιούνταν προσθήκη θρεπτικού μέσου διατήρησης (Maintenance Medium, MM), το οποίο διέφερε από το GM ως προς την περιεκτικότητά του σε βόειο ορό, αφού αυτή ήταν ίση με 2% (2% FBS).

3.4 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας MTT. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης μιας ουσίας και κατά συνέπεια της βιωσιμότητας των κυττάρων. Στηρίζεται στην αναγωγή του βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλθιαζολ)-2,5-διφαινυλτετραζολίου (διάλυμα MTT), το οποίο έχει κίτρινο χρώμα, σε μία αδιάλυτη ένωση που έχει τη μορφή μωβ κρυστάλλων, τη φορμαζάνη, από τις αφυδρογονώσεις του μιτοχονδρίου. Η ενζυμική αναγωγή του διαλύματος MTT αποτελεί δείκτη μιτοχονδριακής δραστηριότητας, γεγονός που προϋποθέτει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Για τη διεξαγωγή της εν λόγω δοκιμασίας, και έπειτα από την προσθήκη θρεπτικού μέσου διατήρησης (2% FBS) στα κύτταρα της καλλιέργειας, 100μl εναιωρήματος κυττάρων επιστρώθηκαν σε κάθε θέση μιας πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, με εξαίρεση το σύνολο των θέσεων της στήλης 12, οι οποίες παρέμειναν κενές ώστε να χρησιμοποιηθούν ως τυφλό (blank, Bl). Η πλάκα επώαστηκε για 24 ώρες στους 37°C, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης κάλυψη της επιφάνειας του συνόλου των θέσεων. Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό υλικό της πλάκας απορρίφθηκε και ακολούθησε η προσθήκη 100μl από τις επιμέρους διαδοχικές αραιώσεις κάθε δείγματος. Η προσθήκη κάθε αραιώσεως έγινε εις τετραπλούν, ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Εξαίρεση αποτέλεσε η προσθήκη των αραιώσεων των κλασμάτων BuOH, οι οποίες προστέθηκαν εις τριπλούν. Στις στήλες 1 και 11 κάθε πλάκας, δεν προστέθηκε ποσότητα των επιμέρους αραιώσεων, παρά μόνο 100μl θρεπτικού μέσου διατήρησης, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες (cell control, CC) της αντίδρασης.

Την προσθήκη των διαδοχικών αραιώσεων και του θρεπτικού μέσου MM ακολούθησε η overnight επώαση της πλάκας στους 37°C. Κατόπιν, 20μl διαλύματος MTT προστέθηκαν σε όλες τις θέσεις της πλάκας, οπότε και πραγματοποιήθηκε εκ νέου επώαση για 1 ώρα στους 37°C με στόχο των σχηματισμό κρυστάλλων φορμαζάνης στα ζωντανά κύτταρα. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, σε κάθε θέση της πλάκας προστέθηκαν 100μl διαλύματος SDS σε αραιό HCl τόσο για τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων όσο και για την αναστολή του δείκτη ερυθρό της φαινόλης του θρεπτικού μέσου MM, ο οποίος θα μπορούσε να επηρεάσει τις μετρήσεις απορρόφησης. Έτσι, η προσθήκη του συγκεκριμένου διαλύματος

προκάλεσε αλλαγή στο χρώμα του θρεπτικού, λόγω μείωσης του pH, οπότε η απορρόφηση, που μετρήθηκε στα 570nm, οφειλόταν μόνο στους κρυστάλλους φορμαζάνης.

mg/ml	CC	ΔΕΙΓΜΑ Α					ΔΕΙΓΜΑ Β				CC	CC	BI
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
16	A												
8	B												
4	C												
2	D												
1	E												
0,5	F												
0,25	G												
0,125	H												

Εικόνα 3.4.1: Ενδεικτική αναπαράσταση της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων

Με βάση τις τιμές της απορρόφησης και με τη βοήθεια του τύπου:

$$\frac{\text{Μέση τιμή απορρόφησης για κάθε αραιώση} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης τυφλού}}{\text{Μέση τιμή απορρόφησης αρνητικού μάρτυρα} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης τυφλού}}$$

υπολογίστηκε, στη συνέχεια, η τοξικότητα που προκαλεί στα κύτταρα κάθε αραιώση των επιμέρους δειγμάτων. Τέλος, οι τιμές τοξικότητας κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μιας γραφικής παράστασης, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (CC₅₀), που ορίζεται ως η συγκέντρωση μιας ουσίας που προκαλεί την καταστροφή του 50% των κυττάρων σε μία μη μολυσμένη καλλιέργεια.

3.5 Έλεγχος της αντιϊκής δράσης των δειγμάτων

Για τη μόλυνση της πλάκας χρησιμοποιήθηκε κλινικό στέλεχος του ιού της γρίπης τύπου Α από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟ», το οποίο είχε ταυτοποιηθεί μοριακά ως H1N1. Για να είναι δυνατή η χρήση του συγκεκριμένου στελέχους στην παρούσα

εργαστηριακή μελέτη, πραγματοποιήθηκαν αρχικά διαδοχικές μολύνσεις κυττάρων MDCK με αυτό, με στόχο την αύξηση του ιϊκού τίτλου έως ότου να εμφανίζεται κυτταροπαθογόνος δράση μία ημέρα μετά τη μόλυνση. Η κυτταροκαλλιέργεια στην οποία παρατηρήθηκε η επιθυμητή κυτταροπαθογόνος δράση απομονώθηκε, ώστε να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Την απομόνωση της κυτταροκαλλιέργειας ακολούθησε η προετοιμασία της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε θέση της πλάκας επιστρώθηκαν 100μl εναιωρήματος κυττάρων από την καλλιέργεια της παραγράφου 3.3, οπότε και πραγματοποιήθηκε επώαση για 24 ώρες στους 37°C, ώστε να επιτευχθεί πλήρης κάλυψη της επιφάνειας του συνόλου των θέσεων. Επόμενο βήμα, μετά το πέρας της επώασης, ήταν η προετοιμασία των δειγμάτων, η οποία περιλάμβανε την παρασκευή των δειγμάτων virus stock και virus control (VC). Για την παρασκευή του virus stock χρησιμοποιήθηκαν 5ml της κυτταροκαλλιέργειας που ήταν μολυσμένη με τον στέλεχος H1N1 και εμφάνιζε την επιθυμητή κυτταροπαθογόνο δράση, 50μl θρυψίνης TPCK, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο κατά την έξοδο του ιού από τα μολυσμένα κύτταρα, και θρεπτικό υλικό MEM μέχρι τελικού όγκου 50ml. Για την παρασκευή του virus control, προστέθηκαν 3,5ml virus stock σε 3,5ml θρεπτικού υλικού MEM. Για την παρασκευή των υπό μελέτη δειγμάτων προστέθηκαν 500μl virus stock σε κάθε μία από τις αραιώσεις που είχαν παρασκευαστεί για κάθε τύπο δείγματος (παράγραφος 3.2.4) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα.

Μετά το πέρας της επώασης, και ύστερα από απόρριψη του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού, πραγματοποιήθηκε η μόλυνση της πλάκας κυτταροκαλλιεργειών. Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε θέση των στηλών 2-9 πραγματοποιήθηκε εις τετραπλούν προσθήκη 200μl από τα δείγματα της παραπάνω παραγράφου, ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αρνητικοί (cell control, CC) και θετικοί μάρτυρες σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, 200μl θρεπτικού υλικού MEM προστέθηκαν σε κάθε θέση των στηλών 1 και 12, ενώ 200μl του δείγματος virus control (VC) προστέθηκαν σε κάθε θέση των στηλών 10 και 11 αντίστοιχα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο θετικός μάρτυρας VC χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκριθεί η κυτταροπαθογόνος δράση του ιού απουσία και παρουσία των δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου.

Την προσθήκη των δειγμάτων ακολούθησε επώαση στους 37°C, έως ότου να παρατηρηθεί ολική καταστροφή των κυττάρων στις στήλες 10 και 11, λόγω της

mg/ml	CC	ΔΕΙΓΜΑ Α				ΔΕΙΓΜΑ Β				VC	VC	CC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
16	A											
8	B											
4	C											
2	D											
1	E											
0,5	F											
0,25	G											
0,125	H											

Εικόνα 3.5.1: Ενδεικτική αναπαράσταση της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, ύστερα από τη μόλυνση με το στέλεχος H1N1.

κυταρροπαθογόνου δράση του ιού. Κατόπιν, η πλάκα τοποθετήθηκε στους -80°C , ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια κάθε θέσης και στη συνέχεια για τις στήλες 2-9 πραγματοποιήθηκε απομόνωση του συνόλου του δείγματος που περιείχε κάθε θέση, ξεκινώντας από τη συγκέντρωση εκείνη όπου παρατηρούνταν αναστολή της δράσης του ιού, ύστερα από την προσθήκη των δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και του συνόλου του υλικού που είχε προστεθεί στις στήλες 10 και 11, προκειμένου να είναι δυνατή η σύγκριση της αναστολής του ιού και μέσω της τεχνικής Real-Time PCR, που περιγράφεται παρακάτω.

3.6 Εκχύλιση ιϊκού RNA

Ύστερα από την απομόνωση των δειγμάτων από την πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ιϊκού RNA σε καθένα από αυτά με τη βοήθεια του χαοτροπικού παράγοντα θειοκυανιούχο γουανιδίνη (GuSCN) (Casas et al., 1996). Πιο συγκεκριμένα, σε πλαστικό σωλήνα 2ml προστέθηκαν 100μl δείγματος, 10μl γλυκογόνο (100mg/ml) και 300μl διάλυμα λύσης GuSCN, και ύστερα από ισχυρή ανάδευση πραγματοποιήθηκε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπυλικής αλκοόλης με επακόλουθη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά

στα 14.000 rcf, απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 500μl 70% αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14.000 rcf, μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O.

3.7 Αντίστροφη μεταγραφφή

Η αντίστροφη μεταγραφφή (Reverse Transcription) είναι η διαδικασία μετατροπής του ιϊκού RNA σε δίκλωνο DNA, μέσω της παραγωγής ενός ενδιάμεσου μονόκλωνου και συμπληρωματικού με το RNA μορίου DNA (cDNA).

Η αντίστροφη μεταγραφφή αποτελούνταν από δύο επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 12μl, ενώ τα δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl. Για τη διεξαγωγή του πρώτου σταδίου, ήταν αρχικά απαραίτητη η παρασκευή ενός διαλύματος mix (Mix 1), το οποίο περιείχε 1pmol του εκκινητή M30F/08, 2mM μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 7μl. Σε πλαστικό σωλήνα 0,5ml προστέθηκαν 7μl από το Mix 1 και 5μl RNA από κάθε δείγμα, οπότε και πραγματοποιήθηκε θέρμανση για 5 λεπτά στους 65°C για την αρχική αποδιάταξη των RNA μορίων. Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο, ώστε να πραγματοποιηθεί το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο περιλάμβανε, αρχικά, την παρασκευή ενός δεύτερου διαλύματος mix (Mix 2), ύστερα από την προσθήκη 1X ρυθμιστικού διαλύματος (5X First Strand Buffer, Nippon Genetics, Japan), 0,01mM DTT, 100U αντίστροφης μεταγραφφής (Fast Gene Scriptase II, Nippon Genetics) και ddH₂O, μέχρι τελικού όγκου 8μl. Ακολούθως, στον ίδιο πλαστικό σωλήνα 0,5ml προστέθηκαν τα 8μl του Mix 2 και πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές επωάσεις, η πρώτη στους 42°C για 50 λεπτά και η δεύτερη στους 70°C για 15 λεπτά.

3.8 Real-Time PCR

Η τεχνική Real-Time PCR (qPCR) επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο μιας αλληλουχίας-στόχο σε ένα δείγμα. Κατά την αντίδραση γίνεται χρήση φθορίζουσών χρωστικών, καθώς ο φθορισμός που εκπέμπουν, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση των αντιγράφων. Αποτέλεσμα της μεταβολής του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης είναι το διάγραμμα Amplification plot, βάσει του οποίου υπολογίζεται η τιμή Ct.

Ως Ct ορίζεται ο κύκλος στον οποίο ο φθορισμός που παράγεται σε ένα δείγμα ξεπερνάει ένα συγκεκριμένο όριο-κατώφλι (threshold). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων στο δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct και άρα ο φθορισμός ανιχνεύεται σε μικρότερο αριθμό κύκλων της αντίδρασης.

Στη συγκεκριμένη εργαστηριακή μελέτη για τη μέτρηση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green, η οποία απορροφά στα 497nm και εκπέμπει στα 520nm, ενώ προσδένεται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA. Λόγω της μη ειδικής σύνδεσής της σε δίκλωνα τμήματα DNA, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της ενίσχυσης των επιθυμητών προϊόντων. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται μέσω της καμπύλης τήξης της αντίδρασης (Melting Curve ή Dissociation Curve), στην οποία καταγράφεται η μεταβολή του φθορισμού που παρατηρείται όταν το δεσμευμένο με τη χρωστική δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (Tm), στην οποία πραγματοποιείται η αποδιάταξή του. Η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων DNA αναμένεται να δώσει την ίδια τιμή Tm.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20μl. Σε αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3μl cDNA από κάθε δείγμα, 20pmol του ζεύγους εκκινητών M30F2 5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3' / M264R3 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3' (10pmol από τον καθένα), 1X ρυθμιστικού διαλύματος (FastGene 2X IC Green), 50nM παθητικής χρωστικής ROX Low, με στόχο την κανονικοποίηση του σήματος φθορισμού και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 20μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου DNA στους 95°C για 2min, ενώ ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 5sec και υβριδοποίησης στους 60°C για 30sec. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των 40 κύκλων ακολούθησε ένα βήμα στους 55°C-95°C, με στόχο τη δημιουργία της καμπύλης τήξης.

3.9 Υπολογισμός τιμής IC₅₀ και δείκτη επιλεκτικότητας (Selectivity Index, SI)

Με βάση τα αποτελέσματα της Real-Time PCR και με τη βοήθεια της εξίσωσης

$$Relative\ Concentration = 2^{\Delta Ct}$$

υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀, που ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας που απαιτείται για την αναστολή στο ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου in vitro. Πιο συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό

της τιμής IC_{50} ήταν αρχικά απαραίτητος ο προσδιορισμός της τιμής ΔCt , η οποία προκύπτει από τον τύπο: $\Delta Ct = Ct(VC) - Ct(\text{δείγματος})$ και εκφράζει την μεταβολή στον αριθμό των ιικών αντιγράφων στα δείγματα που προστέθηκαν η γύρη και το μελισσόψωμο σε σχέση με τον αριθμό των ιικών αντιγράφων στο δείγμα Virus Control (VC). Εφόσον το VC αναμένεται να έχει χαμηλότερο Ct από τα υπό μελέτη δείγματα, η τιμή ΔCt θα έχει αρνητική τιμή. Με βάση την τιμή αυτή, υπολογίστηκε στη συνέχεια η τιμή $2^{\Delta Ct}$, μέσω της οποίας εκφράζεται η σχετική συγκέντρωση (Relative Concentration) των ιικών αντιγράφων σε κάθε δείγμα αναφορικά με τον αριθμό των ιικών αντιγράφων στο δείγμα VC. Από την εφαρμογή της σχέσης $2^{\Delta Ct}$ για το VC, προκύπτει $2^{\Delta Ct} = 2^0 = 1$, αφού στο εν λόγω δείγμα δεν αναμένεται μείωση των ιικών αντιγράφων. Άρα, για τον υπολογισμό της αντιϊκής δράσης καθενός από τα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη γίνεται εφαρμογή του τύπου $1 - 2^{\Delta Ct}$. Από τις τιμές που προέκυψαν και για κάθε δείγμα ξεχωριστά δημιουργήθηκε μια γραφική παράσταση, από την εξίσωσης της οποίας υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} αυτών.

Εφόσον είχαν υπολογιστεί οι τιμές CC_{50} και IC_{50} , υπολογίστηκε και η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας κάθε δείγματος. Η τιμή SI προκύπτει από τον τύπο CC_{50}/IC_{50} και εκφράζει την ικανότητα μιας ουσίας να προκαλεί αναστολή της δράσης του ιού, χωρίς να προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Καθίσταται, λοιπόν, σαφές ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας SI, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η χρήση μιας ουσίας ως θεραπεία έναντι μιας ιικής μόλυνσης, αφού η αντιϊκή δράση αυτής οφείλεται στην αναστολή που προκαλείται στον ιό και όχι στον θάνατο των κυττάρων, λόγω ενδεχόμενης τοξικότητας.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα δοκιμασίας MTT και υπολογισμός CC₅₀

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.4, η εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υπό μελέτη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου MTT, με μέτρηση της απορρόφησης στα 570nm. Βάσει των συγκεκριμένων μετρήσεων, υπολογίστηκε για κάθε δείγμα τόσο ο μέσος όρος της απορρόφησης του τυφλού (blank) και του cell control, όσο και ο λόγος:

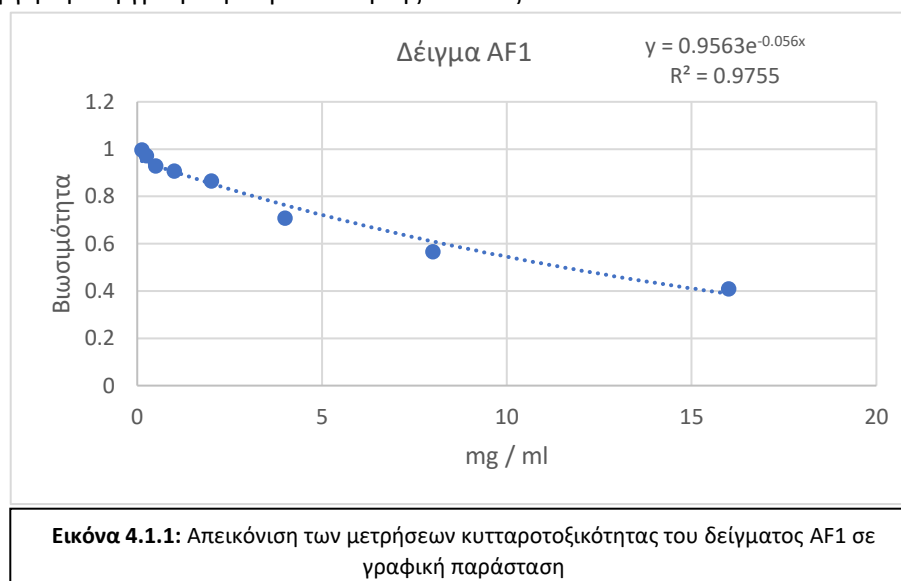
$$\frac{\text{Μέση τιμή απορρόφησης για κάθε αραιώση} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης τυφλού}}{\text{Μέση τιμή απορρόφησης αρνητικού μάρτυρα} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης τυφλού}}$$

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται ενδεικτικά οι μετρήσεις των επιμέρους αραιώσεων του δείγματος AF1.

Πίνακας 4.1.1: Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης και ο υπολογισμός της βιωσιμότητας της κάθε αραιώσης για το δείγμα AF1.

mg/ml	AF1	Blank	CC	Βιωσιμότητα
16	0.350	Μέση τιμή 0.134	Μέση τιμή 0.662	0.410
8	0.433			0.567
4	0.508			0.709
2	0.591			0.865
1	0.613			0.908
0.5	0.625			0.929
0.25	0.647			0.972
0.125	0.660			0.997

Με βάση τις συγκεντρώσεις (mg/ml) και τις τιμές της στήλης Βιωσιμότητα, δημιουργήθηκε η γραφική παράσταση της Εικόνας 4.1.1.



Από την εξίσωση της Εικόνας 4.1.1 υπολογίστηκε τελικά η κυτταροτοξική συγκέντρωση για το δείγμα AF1, η οποία βρέθηκε ίση με 11,57. Με την ίδια διαδικασία υπολογίστηκαν και οι τιμές CC_{50} των υπόλοιπων δειγμάτων, οι οποίες φαίνονται συνολικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1.2).

Πίνακας 4.1.2: Υπολογισμός τιμών CC_{50} των υπό μελέτη δειγμάτων

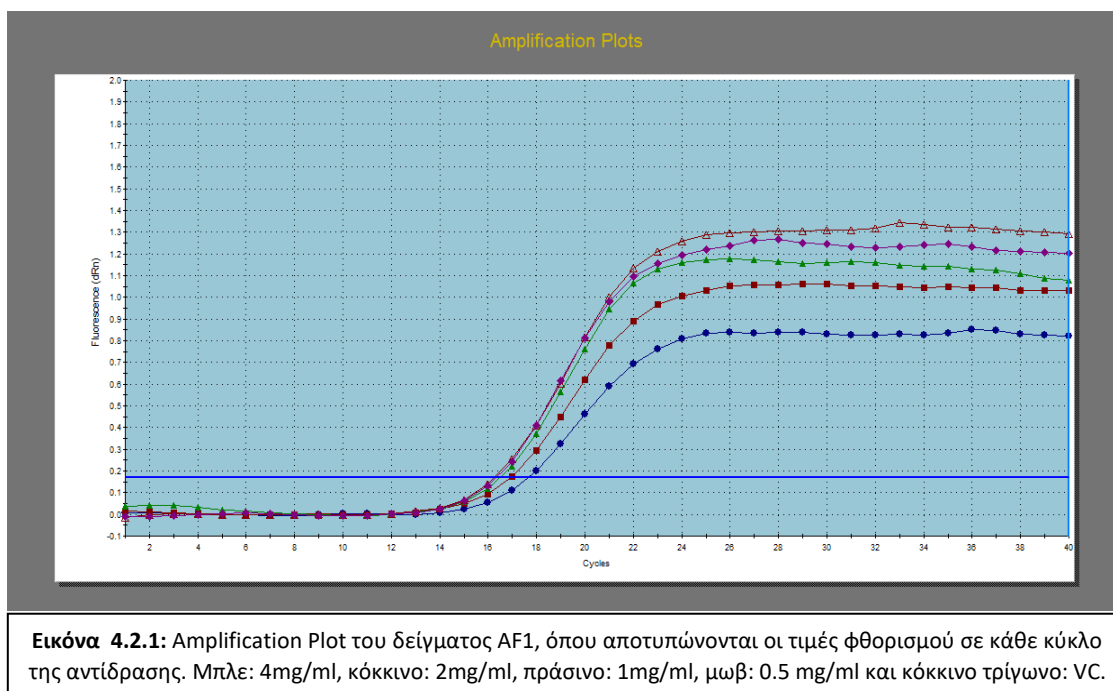
Δείγμα	CC_{50} (mg/ml)
AF1	11.57
AF4	10.63
AF5	11.11
AF17	12
AF1-P	>64
AF4-P	51.18
AF5-P	47.78
AF17-P	>64
BB1	4.88
BB4	0.83
BB6	0.47
BB1-B	>64
BB4-B	>64
BB6-B	>64
BB4-H	7.7
BB6-H	6.97

Από τις παραπάνω τιμές εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα AF1-P και AF17-P, καθώς και τα δείγματα BB1-B, BB4-B και BB6-B εμφανίζουν τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, αφού έχουν τη μεγαλύτερη τιμή CC_{50} και άρα απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών για να εμφανιστεί κυτταροτοξικότητα.

4.2 Υπολογισμός IC_{50} και δείκτη επιλεκτικότητας SI

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.5, για τη διεξαγωγή της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση του συνόλου του δείγματος από κάθε θέση των στηλών 2-9 της πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, ξεκινώντας από τη συγκέντρωση εκείνη όπου παρατηρούνταν αναστολή της δράσης του ιού, ύστερα από την προσθήκη γύρης ή μελισσόψωμου.

Τα δείγματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε Real-Time PCR όπου μέσω του Amplification Plot προέκυψαν οι τιμές Ct για το κάθε δείγμα, αλλά και του ιικού μάρτυρα (VC).

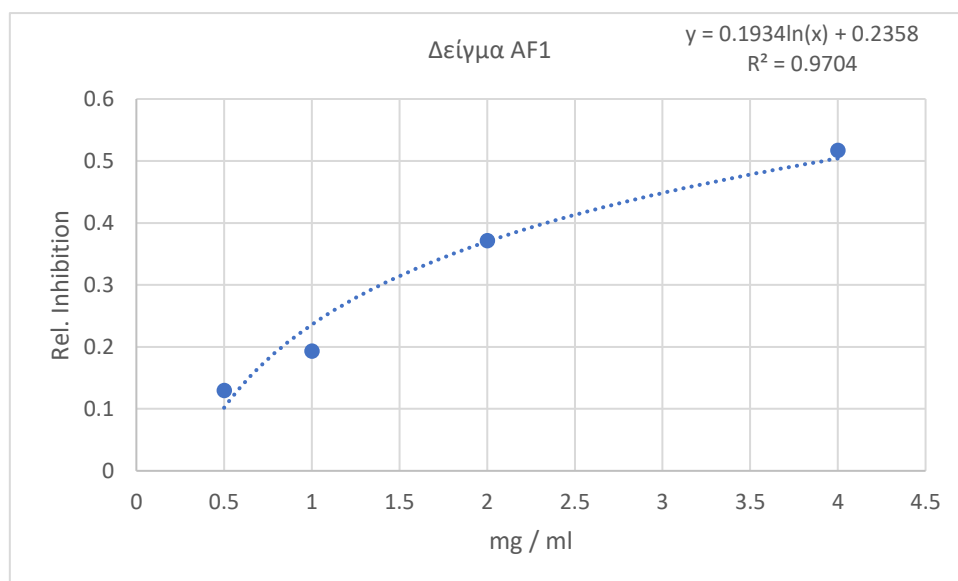


Έπειτα, σύμφωνα με όσα περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.9, πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί των τύπων ΔC_t , $2^{\Delta C_t}$ και $1-2^{\Delta C_t}$. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2.1), φαίνονται ενδεικτικά οι τιμές που προέκυψαν μετά την εφαρμογή των συγκεκριμένων τύπων για κάθε συγκέντρωση του δείγματος AF1.

Πίνακας 4.2.1: Τιμές που προέκυψαν για κάθε συγκέντρωση του δείγματος AF1.

mg/ml	Ct	ΔC_t	Rel. Concentration $2^{\Delta C_t}$	Rel. Inhibition $1-2^{\Delta C_t}$
4	17.35	-1.05	0.483	0.517
2	16.97	-0.67	0.629	0.371
1	16.61	-0.31	0.807	0.193
0.5	16.5	-0.2	0.870	0.129
VC	16.3	0	1	0

Από τις τιμές που προέκυψαν από τον τύπο $1-2^{\Delta C_t}$, δημιουργήθηκε μια γραφική παράσταση, όπως ενδεικτικά φαίνεται για το δείγμα AF1 στην Εικόνα 4.2.2.



Εικόνα 4.2.2: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων του δείγματος AF1 σε συνάρτηση με τις τιμές του τύπου $1-2^{\Delta Ct}$ σε γραφική παράσταση

Από την εξίσωση αυτής της γραφικής παράστασης προέκυψε η τιμή IC_{50} του δείγματος AF1, η οποία βρέθηκε ίση με 3,91mg/ml.

Ομοίως, υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} όλων των δειγμάτων της παρούσας εργαστηριακής μελέτης, οι οποίες φαίνονται συνολικά στον Πίνακα 4.2.2.

Πίνακας 4.2.2: Υπολογισμός τιμών IC_{50} των υπό μελέτη δειγμάτων

Δείγμα	IC_{50} (mg/ml)
AF1	3.91
AF4	10.04
AF5	2.27
AF17	2.47
AF1-P	3.14
AF4-P	2.71
AF5-P	3.37
AF17-P	0.46
BB1	0.16
BB4	0.18
BB6	0.42
BB1-B	2.91
BB4-B	-
BB6-B	-
BB4-H	-
BB6-H	-

Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} ενός δείγματος, τόσο πιο ισχυρή αντιϊκή δράση παρουσιάζει. Από τον Πίνακα 4.2.2 προκύπτει ότι το πρωτεϊνικό δείγμα AF17-P έχει την ισχυρότερη αντιϊκή δράση σε συγκέντρωση 0,46mg/ml, σε αντίθεση με το δείγμα AF4 που παρουσιάζει τη μικρότερη, σε συγκέντρωση 10,04mg/ml. Είναι σημαντικό, ακόμα, να αναφερθεί ότι η τιμή IC_{50} δεν υπολογίστηκε για τα δείγματα BB4-B, BB6-B, BB4-H και BB6-H, καθώς δεν ανιχνεύτηκε αντιϊκή δράση που να σχετίζεται με την αλλαγή των συγκεντρώσεων γύρης και μελισσόψωμου.

Αφού υπολογίστηκαν οι τιμές CC_{50} και IC_{50} των υπό μελέτη δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας SI αυτών, βάσει του λόγου CC_{50}/IC_{50} (Πίνακας 4.2.3).

Πίνακας 4.2.3: Υπολογισμός τιμών SI των υπό μελέτη δειγμάτων

Δείγμα	SI
AF1	2.95
AF4	1.06
AF5	4.89
AF17	4.85
AF1-P	20.38
AF4-P	18.88
AF5-P	14.17
AF17-P	139.13
BB1	31.28
BB4	4.6
BB6	1.12
BB1-B	21.99
BB4-B	-
BB6-B	-
BB4-H	-
BB6-H	-

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.9, όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας ενός δείγματος, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η χρήση του ως αντιϊκή θεραπεία. Επομένως, από τον Πίνακα 4.2.3 γίνεται φανερό ότι το πρωτεϊνικό δείγμα AF17-P παρέχει μεγαλύτερη προστασία έναντι του ιού της γρίπης τύπου A, σε αντίθεση με το δείγμα AF4 που έχει τον μικρότερο δείκτη SI. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τα δείγματα BB4-B, BB6-B, BB4-H και BB6-H δεν υπολογίστηκε ο δείκτης SI, καθώς λόγω της μη ανίχνευσης αντιϊκής δράσης δεν είχαν υπολογιστεί οι τιμές IC_{50} αυτών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας, βρίσκεται η χρήση των προϊόντων κυψέλης ως εναλλακτικές θεραπείες για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων αλλά και μολύνσεων από διάφορα στελέχη ιών. Στα προϊόντα αυτά συγκαταλέγονται μεταξύ άλλων το μέλι, η πρόπολη, καθώς και η γύρη και το μελισσόψωμο (Asoutis-Didaras et al., 2020).

Η παραγωγή του μελισσόψωμου είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, δεδομένου ότι αποτελεί προϊόν ζύμωσης των κόκκων γύρης που συλλέγονται από τις μέλισσες (Gilliam M., 1997). Πιο συγκεκριμένα, οι μέλισσες εναποθέτουν σε ειδικά κελιά της κυψέλης τους γυρεόκοκκους, προσθέτοντας επιπλέον σε αυτά το νέκταρ από τα άνθη, το οποίο αποθηκεύουν στον προλοβό του στομάχου τους, ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά του στην κυψέλη (Ever M. et al., 2016; Wright G.A et al., 2018). Κατά την εναπόθεση του νέκταρ στα ειδικά κελιά με τους κόκκους γύρης, εναποτίθενται, ακόμα, διάφορα ένζυμα που περιέχονται στις αδενικές εκκρίσεις των μελισσών, και όλα μαζί τα απαραίτητα αυτά συστατικά τοποθετούνται στο εσωτερικό των κελιών, ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση (Gilliam M., 1997; Ever M. et al., 2016).

Κατά τη διαδικασία ζύμωσης των κόκκων γύρης είναι απαραίτητη και η παρουσία βακτηρίων που ενοφθαλμίζονται από τις μέλισσες μέσω του προλοβού τους, αλλά και βακτηρίων που προέρχονται από τα άνθη και από το περιβάλλον της κυψέλης (Martinson V.G. et al., 2011; Anderson K.E. et al., 2014). Ανάλυση του μικροβιώματος του πεπτικού συστήματος των μελισσών έχει δείξει ότι σημαντικό ρόλο στη ζύμωση της γύρης προς παραγωγή μελισσόψωμου παίζουν τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ, τα οποία και θεωρούνται ως η πρωταρχική καλλιέργεια βακτηρίων που ενοφθαλμίζεται από τις μέλισσες, προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης (Vasquez A. et al., 2009). Αρκετά από αυτά τα βακτήρια εντοπίζονται και στο μικροβίωμα του μελισσόψωμου, το οποίο περιλαμβάνει τόσο δυνητικά όσο και υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, γεγονός που δείχνει ότι η ζύμωση των γυρεόκοκκων γίνεται κάτω από μια διαβαθμισμένη συγκέντρωση O_2 , η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή τους (Mattila H.R. et al., 2012).

Όσον αφορά στη χημική τους σύσταση, τόσο η γύρη όσο και το μελισσόψωμο αποτελούν υψηλής θρεπτικής αξίας προϊόντα, καθώς διακρίνονται για την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και πολυφαινόλες, συστατικά που σχετίζονται με τις βιολογικές, θρεπτικές, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές τους ιδιότητες (Bakour M. et al., 2019; Isidorov V. et al., 2009; Kostic A. Z. et al., 2020; Margaroan R. et al., 2019). Ωστόσο,

μεταξύ των δύο προϊόντων κυψέλης παρατηρούνται ορισμένες διαφορές ως προς τις ποσότητες των θρεπτικών συστατικών που περιέχουν, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη διάσπαση που υφίστανται οι γυρεόκοκκοι κατά τη διαδικασία παραγωγής του μελισσόψωμου με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του τελικού αυτού προϊόντος (Urcan A. et al., 2017; Cremonez T.M. et al., 1998; Hagedorn H.H. et al., 1968).

Η υψηλή θρεπτική αξία των συγκεκριμένων προϊόντων κυψέλης είναι αυτή που τα καθιστά αντικείμενα επιστημονικών ερευνών, για τη χρήση τους ως θεραπεία έναντι βακτηριακών λοιμώξεων και ιικών μολύνσεων (Asoutis-Didaras N. et al., 2020). Μέχρι σήμερα πληθώρα ερευνών έχει αναδείξει την αντιβακτηριακή τους δράση, ενώ η ύπαρξη αντιϊκής δράσης επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά, ύστερα από τη χρήση τους έναντι του εντεροϊού D-68 (EV-D68) (Asoutis-Didaras N. et al., 2021). Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη την ικανότητα της γύρης και του μελισσόψωμου να αναστέλλουν τη δράση του συγκεκριμένου ιικού στελέχους, στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν ο έλεγχος της αντιϊκής τους δράσης έναντι του ιού της γρίπης τύπου A.

Ο ιός της γρίπης τύπου A ανήκει στην οικογένεια Orthomyxoviridae και περιέχει οκτώ τμήματα μονόκλωνου RNA (ssRNA) αρνητικής πολικότητας (-ssRNA), τα οποία κωδικοποιούν για 10 πρωτεΐνες. Τα ιϊκά σωματίδια παρουσιάζουν ελικοειδή συμμετρία και περιβάλλονται από εξωτερικό περίβλημα (φάκελο). Στην εξωτερική επιφάνεια του ιού εδράζεται ένας μεγάλος αριθμός γλυκοπρωτεϊνών, με κυριότερες την αιμοσυγκολλητίνη (HA) και τη νευραμινιδάση (NA), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή (Shors T., 2017). Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσυγκολλητίνη (HA) προσκολλάται σε κατάλοιπα σιαλικού οξέος των γλυκοπρωτεϊνών ή των γλυκολιπιδίων των κυττάρων του κροσσώτου επιθηλίου των αεραγωγών και της ρινικής κοιλότητας του ξενιστή. Τα ιϊκά σωματίδια εισέρχονται με ενδοκυττάρωση στο εσωτερικό των κυττάρων και ακολουθεί η απέκδυση, αποτέλεσμα της οποίας είναι μεταφορά του συμπλόκου RNP στον πυρήνα. Εκεί, πραγματοποιείται η μεταγραφή των οκτώ τμημάτων RNA του ιού, τα οποία στη συνέχεια εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, όπου και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Ακολουθεί η συναρμολόγηση των νέων ιϊκών σωματίων και η απελευθέρωσή τους με εκβλάστηση, διαδικασία κατά την οποία σημαντικό ρόλο έχει η νευραμινιδάση (NA) (Das K. et al., 2010; Shors T., 2017).

Μέχρι σήμερα ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την πρόληψη των μολύνσεων με ιό της γρίπης τύπου A είναι ο εμβολιασμός. Από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) έχουν εγκριθεί τρεις τύποι εμβολίων, εκ των οποίων ο ένας περιλαμβάνει

ζωντανούς εξασθενημένους ιούς της γρίπης τύπου A και B, ο δεύτερος πρόκειται για ανασυνδυασμένο εμβόλιο κατασκευασμένο από καθαρισμένη πρωτεΐνη H, ενώ ο τρίτος για ανενεργό εμβόλιο που παράγεται σε καλλιέργειες κυττάρων MDCK (Shors T., 2017). Εκτός των εμβολίων, είναι εμπορικά διαθέσιμη μια ποικιλία αντιϊκών φαρμάκων, που διακρίνονται σε M2 αναστολείς και αναστολείς της νευραμινιδάσης και στόχο έχουν την αναστολή του κύκλου ζωής του ιού (Monto A., 2003; Moscona A., 2005).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γύρης και μελισσόψωμου, με στόχο τον έλεγχο της αντιϊκής τους δράσης έναντι ενός κλινικού στελέχους ιού της γρίπης τύπου A, που είχε ταυτοποιηθεί μοριακά ως H1N1. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα γύρης, τρία δείγματα μελισσόψωμου που παρασκευάστηκαν μέσω τεχνητής ζύμωσης από βακτήρια που είχαν απομονωθεί από φυσικό μελισσόψωμο, καθώς και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τους κλάσματα και πέντε κλάσματα γύρης και μελισσόψωμου σε βουτανόλη (BuOH) και νερό (H₂O).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η χρήση των κλασμάτων βουτανόλης και νερού στη συγκεκριμένη εργαστηριακή μελέτη γίνεται με στόχο τον προσδιορισμό του κλάσματος εκείνου στο οποίο παρουσιάζεται αντι-ϊκή δράση έναντι του ιού της γρίπης τύπου A. Πιο συγκεκριμένα, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, κατά την κλασμάτωση σε νερό επιτυγχάνεται η απομόνωση σακχάρων και πρωτεϊνών, ενώ κατά την κλασμάτωση σε βουτανόλη απομονώνονται πολυφαινόλες. Επομένως, με την ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR είναι δυνατή η εξαγωγή ενός πρώτου συμπεράσματος σχετικά με το αν οι πρωτεΐνες ή πολυφαινόλες συμβάλλουν στη μείωση του ιϊκού τίτλου.

Για να είναι δυνατός ο έλεγχος της αντιϊκής δράσης του συνόλου των δειγμάτων, έπρεπε αρχικά να ελεγχθεί η κυτταροτοξική τους δράση. Για τον λόγο αυτό, και αφού πραγματοποιήθηκαν 8 διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να προκύψουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για κάθε τύπο δείγματος, πραγματοποιήθηκε η χρωματομετρική δοκιμασία MTT, με στόχο να υπολογιστεί η τοξικότητα που προκαλούσε στα κύτταρα καθεμιά από τις εν λόγω αραιώσεις. Με βάση τις τιμές που προέκυψαν, υπολογίστηκε για κάθε δείγμα η τιμή CC₅₀, για την οποία ισχύει ότι όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο λιγότερη είναι κυτταροτοξική δράση που εμφανίζει το δείγμα, αφού απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτού για να προκαλέσει τον θάνατο του 50% των κυττάρων μιας καλλιέργειας. Με βάση τις τιμές του πίνακα 4.1.2, όπου φαίνονται συνολικά οι τιμές CC₅₀ των υπό εξέταση δειγμάτων, προκύπτουν για κάθε τύπο δείγματος τα παρακάτω συμπεράσματα. Μεταξύ των δειγμάτων AF1, AF4, AF5 και AF17, το δείγμα AF17 εμφανίζει τη μεγαλύτερη τιμή CC₅₀ και ακολουθούν

τα AF1, AF5 και AF4. Γίνεται φανερό ότι το AF17 είναι λιγότερο τοξικό σε σχέση με το δείγμα γύρης AF1, από το οποίο και προέκυψε μέσω τεχνητής ζύμωσης. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι τόσο οι διαφορετικές συνθήκες όσο και η ίδια διαδικασία της ζύμωσης των δειγμάτων που προέκυψαν από το δείγμα AF1 επηρεάζει την τοξικότητά τους.

Όσον αφορά στα πρωτεϊνικά δείγματα AF1-P, AF4-P, AF5-P και AF17-P, παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που προαναφέρθηκαν, δηλαδή ότι το δείγμα AF17-P εμφανίζει τη μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με τα δείγματα AF1-P, AF4-P και AF5-P. Επιπλέον, είναι φανερό ότι σε σχέση με τα δείγματα γύρης και τεχνητού μελισσόψωμου, τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τους δείγματα είναι λιγότερο τοξικά, αφού απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για να προκαλέσουν την καταστροφή του 50% της κυτταροκαλλιέργειας.

Αναφορικά με τα δείγματα BB1, BB4 και BB6, παρατηρείται από τις τιμές CC_{50} , που είχαν προκύψει από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, ότι είναι ιδιαίτερα τοξικά για τα κύτταρα, γεγονός που ισχύει και στην περίπτωση των υδατικών κλασμάτων αυτών. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν ισχύει στην περίπτωση των κλασμάτων βουτανόλης, για τα οποία προέκυψαν υψηλές τιμές CC_{50} .

Επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της αντιϊκής δράσης των δειγμάτων, έπειτα από επώαση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων αυτών με κλινικό δείγμα ιού H1N1 σε κύτταρα MDCK. Αφού παρατηρήθηκε πλήρης καταστροφή των κυττάρων μετά την προσθήκη του δείγματος VC, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του συνόλου του υλικού από κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλοποίησης και ακολούθησε εκχύλιση του ιϊκού RNA, αντίστροφη μεταγραφή για τη σύνθεση του συμπληρωματικού μορίου cDNA και Real-Time PCR, με στόχο των προσδιορισμό των ιϊκών αντιγράφων στα επιμέρους δείγματα. Εφόσον από την παρατήρηση της πλάκας φάνηκε ότι ορισμένες από τις αραιώσεις των δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου προκαλούν την αναστολή της δράσης του ιού, αναμένεται ότι θα έχουν μεγαλύτερα Ct σε σχέση με το δείγμα VC, όπου ο αριθμός των ιϊκών αντιγράφων ήταν μεγαλύτερος. Αφού έγινε καταγραφή των Ct των αραιώσεων κάθε δείγματος, προσδιορίστηκαν οι τιμές ΔCt , $2^{\Delta Ct}$ και $1-2^{\Delta Ct}$. Από τις εν λόγω τιμές δημιουργήθηκε για κάθε δείγμα μια γραφική παράσταση, από την εξίσωση της οποίας προέκυψε η τιμή IC_{50} . Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.2, όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} ενός δείγματος τόσο ισχυρότερη είναι η αντιϊκή του δράση. Βάσει των τιμών που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.2, προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα για κάθε τύπο δείγματος.

Όσον αφορά στα δείγματα AF1, AF4, AF5 και AF17, χαμηλές τιμές IC_{50} έδωσαν τα δείγματα AF5 και AF17, ενώ στην περίπτωση των πρωτεϊνικών τους δειγμάτων την χαμηλότερη τιμή IC_{50} είχε το δείγμα AF17-P. Σε αντίθεση με την υψηλή κυτταροτοξική τους δράση, τα δείγματα BB1, BB4 και BB6 εμφάνισαν υψηλή αντιϊκή δράση, αφού οι τιμές IC_{50} ήταν ιδιαίτερα χαμηλές, ενώ με εξαίρεση το δείγμα BB1-B, για κανένα άλλο από τα κλάσματα βουτανόλης και νερού δεν ανιχνεύτηκε αντιϊκή δράση. Η απουσία αντιϊκής δράσης στα κλάσματα είναι δυνατό να οφείλεται σε δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, τα κλάσματα υπέστησαν την αρχική τους επεξεργασία από διαφορετικό εργαστήριο, γι' αυτό και δεν υπάρχουν λεπτομέρειες αναφορικά με τις συνθήκες κλασμάτωσης, οι οποίες και μπορούν να επηρεάσουν τη συνολική σύσταση των κλασμάτων. Δεύτερον, κατά την κλασμάτωση τα συστατικά των δειγμάτων της γύρης και του μελισσόψωμου αραιώνονται σε μεγάλο βαθμό, οπότε οι τελικές συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών, και ιδιαίτερα των πρωτεϊνών, θα διαφέρουν σημαντικά, σε σχέση με τη συγκέντρωση που είχαν μετά την παρασκευή τους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραγράφου 3.2.2.

Εφόσον είχαν υπολογιστεί οι τιμές CC_{50} και IC_{50} όλων των υπό μελέτη δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε και ο υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας SI, με στόχο την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας χρήσης κάθε δείγματος ως θεραπεία έναντι του ιού της γρίπης τύπου Α. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης SI, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το δείγμα. Αναμένεται ότι δείγματα που εμφάνισαν υψηλή τιμή CC_{50} και χαμηλή τιμή IC_{50} , θα εμφανίζουν δείκτη SI με υψηλή τιμή. Συγκρίνοντας μεταξύ τους τους διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, γίνεται φανερό ότι από τα δείγματα AF1, AF4, AF5 και AF17, τις υψηλότερες τιμές SI έδωσαν τα δείγματα AF5 και AF17. Ωστόσο, τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά τους δείγματα έδωσαν μεγαλύτερες τιμές SI, με το δείγμα AF17-P να εμφανίζει την υψηλότερη. Στην περίπτωση των δειγμάτων BB1, BB4 και BB6, τη μεγαλύτερη τιμή SI εμφάνισε το δείγμα BB1, ενώ σε ό,τι αφορά στα κλάσματα των εν λόγω δειγμάτων, η τιμή SI υπολογίστηκε μόνο για το δείγμα BB1-B, και βρέθηκε να είναι αρκετά υψηλή.

Με βάση όσα αναφέρονται παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες που περιέχονται στη γύρη και το μελισσόψωμο ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την αντιϊκή δράση αυτών των προϊόντων. Εκτός από τις πρωτεΐνες, φαίνεται ότι και οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στην προστασία έναντι του ιού της γρίπης, δεδομένου ότι ο δείκτης επιλεκτικότητας του δείγματος BB1-B ήταν υψηλός. Ωστόσο, η αδυναμία ανίχνευσης αντίστοιχης δράσης στα υπόλοιπα κλάσματα βουτανόλης δεν επιτρέπει την αξιόπιστη αξιολόγηση του συγκεκριμένου αποτελέσματος.

Συνολικά, τα πρωτεϊνικά δείγματα δίνουν μια πρώτη εικόνα για το συστατικό στο οποίο οφείλεται η αντιϊκή δράση της γύρης και του μελισσόψωμου. Απαιτούνται, όμως, μελέτες σε μεγαλύτερο και άρα περισσότερο αντιπροσωπευτικό αριθμό τέτοιου είδους δειγμάτων, ώστε να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα, ενώ θα πρέπει, επιπλέον, να διερευνηθεί εκτενέστερα και ο ρόλος των πολυφαινολών.

6. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abedini A, Shafaghi S, Ameri Ahmad Z, et al. *N-Chromosome royal jelly, propolis and bee pollen supplementation improve the clinical conditions of COVID-19 patients: A randomized controlled trial*. Trad Integr Med 2. (2022).
- Abouda Z., Zerdani I., Kalalou I., Faid M., Ahami M.T. *The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria*. Res. J. Microbiol. 2011, 6, 376–384. (2011).
- Anderson K.E., Carroll M.J., Sheehan T., Lanan M.C., Mott B.M., Maes P., Corby-Harris V. *Hive-stored pollen of honeybees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion*. Mol. Ecol. 2014, 23, 5904–5917. (2014).
- Arruda V., Pereira A., Freitas A., Barth O., Almeida-Muradian L. *Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition*. J. Food Compos. Anal. 2013, 29, 100–105. (2013).
- Asoutis Didaras N., Karatasou K., Dimitriou T., Amoutzias G.D., Mossialos D. *Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives*. Antibiotics (Basel) 2020; 9(11): 811. (2020).
- Asoutis Didaras N., Dimitriou T., Daskou M., Karatasou K., Mossialos D. *In vitro assessment of the antiviral activity of Greek bee bread and bee collected pollen against enterovirus D68*. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 2021, 20, e4859. (2021).
- Bakour, M., Al-Waili, N. S., El Menyiy, N., Imtara, H., Figuira, A. C., AlWaili, T., &Lyoussi, B. *Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity*. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(13), 4205–4212. doi:10.1007/s13197-017-2889-9. (2017).
- Bakour M., Fernandes A., Barros L., Soković M., Ferreira I., Badiá L. *Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties*. LWT 2019, 109. (2019).
- Barene I., Daberte I., Siksná S. *Investigation of bee bread and development of its dosage forms*. Medicinos Teorija ir Praktika 2014, 21, 16–22. (2014).

- Bridi R., Atala E., Pizarro P.N., Montenegro G. *Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity*. J. Nat. Prod. 2019, 82, 559–565. (2019).
- Campos M.G.R., Bogdanov S., De Almeida-Muradian L.B., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F. *Pollen composition and standardisation of analytical methods*. J. Apic. Res. 2008, 47, 154–161. (2008).
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Brieseman T., Hornig M., Geiser D.M., et al. *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. Science 2007, 318, 283–287. (2007).
- Cremonese T.M., De Jong D., Bitondi M. *Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae)*. J. Econ. Entomol. 1998, 91, 1284–1289. (1998).
- Das K., Aramini J.M., Ma L., Krug R., Arnold E. *Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets*. Nature Structural & Molecular Biology. 2010, 17, 530–538. (2010).
- Eisfeld A.J., Neymann G., Kawaoka Y., Influenza A virus isolation, culture and identification. Nat Protoc. 2014 November; 9(11):2663–2681. doi:10.1038/nprot.2014.180. (2014).
- Estevinho L., Rodrigues S., Pereira A., Sanchez X. *Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation*. Int. J. Food Sci. Technol. 2011, 47, 429–435. (2011).
- Eyer M., Neumann P., Dietemann V.A. *Look into the Cell: Honey Storage in Honey Bees, Apis mellifera*. PLoS ONE. 2016.11(8): e0161059. (2016).
- Fan T.-F., Park S., Shi Q., Zhang X., Liu Q., Song Y., Chin H., Ibrahim M.S.B., Mokrzecka N., Yang Y., et al. *Transformation of hard pollen into soft matter*. Nat. Commun. 2020, 11, 1449. (2020).
- Farag S., El-Rayes T. *Effect of Bee-pollen Supplementation on Performance, Carcass Traits and Blood Parameters of Broiler Chickens*. Asian J. Anim. Vet. Adv. 2016, 11, 168–177. (2016).
- Foot H.L. *Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production*. Am. Bee J. 1957, 97, 476–478. (1957).

- Fuenmayor C., Zuluaga-Domínguez C., Díaz-Moreno A., Quicazán M., Cosío S., Mannino S. *Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen*. Rev. MVZ Córdoba 2014, 19, 4003–4014. (2014).
- Gilliam M. *Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honeybees*. FEMS Microbiol. Lett. 1997, 155, 1–10. (1997).
- Gilliam, M. *Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts*. Apidologie 1979, 10, 43–53. (1979).
- Graikou K., Kapeta S., Aligiannis N., Sotiroudis G., Chondrogianni N., Gonos E., Chinou I. *Chemical analysis of Greek pollen-antioxidant, antimicrobial and proteasome activation*. Chem. Cent. J. 2011, 5, 33. (2011).
- Hagedorn H.H., Moeller F.E. *Effect of the Age of Pollen Used in Pollen Supplements on Their Nutritive Value for the Honeybee. I. Effect on Thoracic Weight, Development of Hypopharyngeal Glands, and Brood Rearing*. J. Apic. Res. 1968, 7, 89–95. (1968).
- Haydak M.H. *Pollen—Pollen substitutes—Beebread*. Am. Bee J. 1958, 98, 145–146. (1958).
- Haydak M.H., Vivino A.E. *The Changes in the Thiamine, Riboflavin, Niacin and Pantothenic Acid Content in the Food of Female Honeybees during Growth with a Note on the Vitamin K Activity of Royal Jelly and Beebread*. Ann. Entomol. Soc. Am. 1950, 43, 361–367. (1950).
- Herbert E.W., Shimanuki H. *Chemical Composition and Nutritive Value of Bee-Collected and Bee-Stored Pollen*. Apidologie 1978, 9, 33–40. (1978).
- Isidorov V., Isidorova A., Szczepaniak L., Lazarek U. *Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread*. Food Chem. 2009, 115, 1056–1063. (2009).
- Jaisinghani R. *Antibacterial properties of quercetin*. Microbiol. Res. 2017, 8. (2017).
- Jeyapragakash A., Hoy M.A., Allsopp M.H. *Bacterial diversity in worker adults of Apis mellifera capensis and Apis mellifera scutellata (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences*. J. Invertebr. Pathol. 2003, 84, 96–103. (2003).

- Karadal F., Onmaz N.E., Abay S., Yildirim Y., Al S., Tatyuz I., Akcay A. *A Study of Antibacterial and Antioxidant Activities of Bee Products: Propolis, Pollen and Honey Samples*. Ethiop. J. Health Dev. 2018, 32, 116–122. (2018).
- Khider M., Elbanna K., Mahmoud A., Owayss A.A. *Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements*. Food Sci. Biotechnol. 2013, 22, 1–9. (2013).
- Killer J., Dubná S., Sedláček I., Švec P. *Lactobacillus apis sp. nov., from the stomach of honeybees (Apis mellifera), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014, 64, 152–157. (2014).
- Kostic A.Ž., Milincic D.D., Barac M.B., Ali Shariati M., Tešić Ž.L., Pešić M.B. *The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient-The Present and Perspectives*. Biomolecules 2020, 10, 84. (2020).
- Lee IK, Hwang B, Kim DW, et al. *Characterization of neuraminidase inhibitors in Korean papaver rhoas bee pollen contributing to anti-influenza activities in vitro*. Planta Med 2016; 82(6): 524-9. (2016).
- Margaoan R., Strant M., Varadi A., Topal E., Yücel B., Cornea-Cipcigan M. Campos M.G., Vodnar D.C. *Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits*. Antioxidants 2019, 8, 568. (2019).
- Margaoan R., Marghitas L., Dezmirean D., Francisc D., Bunea A., Socaci S., Bobis O. *Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected Pollen*. J. Agric. Food Chem. (2014).
- Markiewicz-Zukowska R., Naliwajko S., Bartosiuk E., Moskwa J., Isidorov V., Soroczynska J., Borawska M. *Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG)*. J. Apic. Sci. 2013, 57. (2013).
- Martinson V.G., Danforth B.N., Minckley R.L., Rueppell O., Tingek S., Moran N.A. *A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees*. Mol. Ecol. 2011, 20, 619–628. (2011).

- Mattila H.R., Rios D., Walker-Sperling V.E., Roeselers G., Newton I.L.G. *Characterization of the active microbiotas associated with honeybees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse*. PLoS ONE 2012, 7, e32962. (2012).
- Monto, A. The role of antivirals in the control of influenza. *Vaccine*, 21(16), 1796–1800. doi:10.1016/s0264-410x(03)00075-6. (2003).
- Morais M., Moreira L., Feás X., Estevinho L.M. *Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity*. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 1096–1101. (2011).
- Moscona A. *Neuraminidase Inhibitors for Influenza*. *N Engl J Med* 2005; 353:1363-1373 DOI: 10.1056. (2005).
- Nagai T., Nagashima T., Myoda T., Inoue R. *Preparation and functional properties of extracts from bee bread*. *Nahrung* 2004, 48, 226–229. (2004).
- Nogueira C., Iglesias A., Sanchez X., Estevinho L. *Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach*. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 11173–11187. (2012).
- Olofsson T.C., Vásquez A. *Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera**. *Curr. Microbiol.* 2008, 57, 356–363. (2008).
- Pascoal A., Rodrigues S., Teixeira A., Feás X., Estevinho L.M. *Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory*. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 63, 233–239. (2014).
- Salazar-González C., Díaz-Moreno C. *The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process*. *J. Apic. Res.* 2016, 55, 161–175. (2016).
- Sharma A., Kaur M., Katnoria J.K., Nagpal A.K. *Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction*. *Curr. Med. Chem.* 2018, 25, 4740–4757. (2018).
- Shors T. *Influenza Viruses, Understanding Viruses*, 3rd ed., Jones & Bartlett Learning, LLC. (2017).
- Simopoulos A.P. *Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development*. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991, 54, 438–463. (1991).

- Sobral F., Calhella R.C., Barros L., Duenas M., Tomas A., Santos-Buelga C., Vilas-Boas M., Ferreira I.C. *Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal*. *Molecules* 2017, 22, 248. (2017).
- Urcan A., Criste A., Dezmirean D., Bobis O., Mărghită L., Mărgăoan R., Hrinca A. *Antimicrobial Activity of Bee Bread Extracts Against Different Bacterial Strains*. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* 2018, 75, 7. (2018).
- Urcan A., Criste A., Dezmirean D., Margaoan R., Caeiro A., Campos M. *Similarity of Data from Bee Bread with the Same Taxa Collected in India and Romania*. *Molecules* 2018, 23, 2491. (2018).
- Urcan A., Marghită L., Dezmirean D., Bobis O., Bonta V., Muresan C., Margaoan R. *Chemical Composition and Biological Activities of Beebread—Review*. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol.* 2017, 74, 6. (2017).
- Vásquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C. *Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees*. *PLoS ONE* 2012, 7, e33188. (2012).
- Vásquez A., Olofsson T.C. *The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread*. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 189–195. (2009).
- Velásquez P., Rodríguez K., Retamal M.A., Giordano A., Valenzuela L.M., Montenegro G. *Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multifloral bee pollen*. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2017, 90, 306–314. (2017).
- Von Schacky C., Harris W.S. *Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids*. *Cardiovasc. Res.* 2007, 73, 310–315. (2007).
- Wang S., Yao J., Zhou B., Yang J., Chaudry M.T., Wang M., Xiao F., Li Y., Yin W. *Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro*. *J. Food Prot.* 2018, 81, 68–78. (2018).
- World Health Organization. *Influenza at the Human-Animal Interface- Summary and Assessment as of 27 June 2014*
- Wright G.A, Nicolson S.W., Shafir S. *Nutritional Physiology and Ecology of HoneyBees*. *Annu. Rev. Entomol.* 2018. 63:327-44. (2018).

Zuluaga C., Martínez A., Fernández J., López-Baldó J., Quiles A., Rodrigo, D. *Effect of High-Pressure Processing on Carotenoid and Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2016, 37. (2016).