



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

« Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γηγενών δειγμάτων μελιού μέσω αξιολόγησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN45) »



Αγγελάκη Μερóπη του Σεραφείμ

Λάρισα 2023

« Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γηγενών δειγμάτων μελιού μέσω αξιολόγησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN45) »

« Assessment of the antioxidant activity of native honey samples through the evaluation of redox biomarkers in human gastric cancer cells (MKN45) »

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων)

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

Βεσκούκης Αριστείδης

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

Σκαπέρδα Ζωή-Βασιλική

Εντεταλμένη Διδάσκουσα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω κ. Κουρέτα για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αλλά και για την βοήθεια και καθοδήγηση του. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή, κ. Αριστείδη Βεσκούκη και την κ. Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη μου, Αναστασία Πατούνα, για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου, καθώς και για την υποστήριξη, τον χρόνο και τις πληροφορίες που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Τέλος, ευχαριστώ τα όλα μέλη του εργαστηρίου για την προθυμία τους να λυθεί οποιαδήποτε απορία μου, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό προϊόν αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής εδώ και χιλιάδες χρόνια. Εκτός από τη γλυκύτητά του, το μέλι χαρακτηρίζεται και για τις αντιοξειδωτικές του. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού οφείλονται στην παρουσία διάφορων ενώσεων, όπως οι πολυφαινόλες και βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης τριών (3) δειγμάτων μελιού στην κυτταρική σειρά γαστρικού ανθρώπινου καρκίνου, MKN45. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε Γαλάζιο Αγκάθι που είναι μονοανθικό, και τα μέλι Δάσους και Ανθόμελο που χαρακτηρίζονται ως πολυανθικά. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις (3.125, 6.25, 12.5 και 25 mg/ml για τα δυο πρώτα δείγματα και 1.56, 3.125, 6.25 και 12.5 mg/ml για το τρίτο δείγμα) για 24 ώρες. Στην συνέχεια, έγινε αξιολόγηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης (TAC, TBARS και Protein carbonyls) με την χρήση φασματοφωτομετρίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα μελιού εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα MKN45, προκαλώντας βελτίωση στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Τελικά, το δείγμα με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ήταν το Ανθόμελο και στην συνέχεια ακολουθεί το μέλι Δάσους και το Γαλάζιο Αγκάθι.

ABSTRACT

Honey is a natural product that has been an integral part of the human diet for thousands of years. Apart from its sweetness, honey is known for its antioxidant properties. The antioxidant properties of honey are attributed to the presence of various compounds, such as polyphenols, which help protect cells from oxidative damage caused by free radicals. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity of three honey samples on the gastric cancer cell line MKN45. In this study, *Eryngium creticum* honey, which is monofloral, and forest honey and blossom honey, which are multifloral, were used. The cells were treated with selected concentrations (3.125, 6.25, 12.5, and 25 mg/ml for the first two samples, and 1.56, 3.125, 6.25 and 12.5 mg/ml for the third sample) for 24 hours. Subsequently, the oxidative stress biomarkers (TAC, TBARS, and Protein carbonyls) were evaluated by spectrophotometry. The results showed that the honey samples exhibited antioxidant activity on MKN45 cells, leading to improvements in redox biomarkers. Finally, the most interesting sample was Blossom honey, followed by Forest honey and *Eryngium creticum* honey.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	9
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	10
1.2.1 Οξειδωτική Φωσφορυλίωση.....	11
1.2.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών στο κυτταρόπλασμα	11
1.2.3 Φαγοκυττάρωση	12
1.2.4 Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών	13
1.3 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	13
1.3.1 Θετική επίδραση.....	13
1.3.2 Αρνητική επίδραση.....	15
1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	16
1.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	17
1.5.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα.....	17
1.5.2 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες.....	18
1.5.3 Ψυχιατρικές ασθένειες.....	18
1.5.4 Καρκίνος.....	19
1.5.5 Σακχαρώδης διαβήτης	19
1.6 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	19
1.6.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά	20
1.6.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά.....	21
1.7 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	21
1.8 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΜΕΛΙΟΥ	23
1.9 APIS MELLIFERA	24
1.10 ΕΙΔΗ ΜΕΛΙΟΥ	24
1.11 ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΛΙΟΥ	25
1.11.1 Σάκχαρα.....	25
1.11.2 Πρωτεΐνες	26

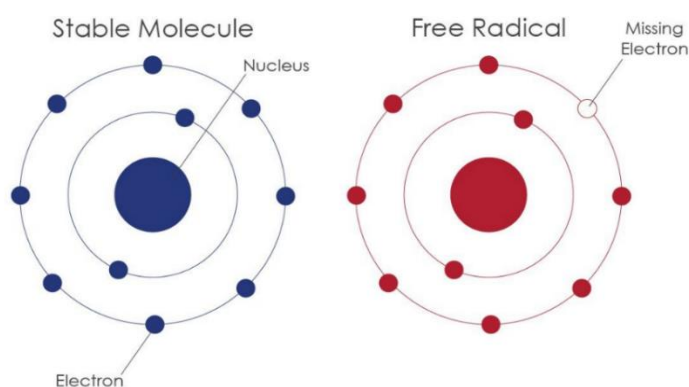
1.11.3 Οργανικά οξέα	27
1.11.4 Βιταμίνες	27
1.11.5 Ιχνοστοιχεία.....	27
1.11.6 Πτητικές ενώσεις	28
1.11.7 Φαινολικές ενώσεις	28
1.12 ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΜΕΛΙΟΥ	29
1.13 ΜΕΛΙ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ	30
1.13.1 Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού	30
1.13.2 Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού.....	31
1.13.3 Η αποπτωτική δράση του μελιού.....	31
1.13.4 Η αντιφλεγμονώδης δράση του μελιού	31
1.13.5 Σακχαρώδης διαβήτης	32
1.13.6 Καρκίνος.....	32
1.13.7 Άσθμα.....	32
1.13.8 Καρδιαγγειακές παθήσεις.....	33
1.13.9 Η νευρολογική επίδραση του μελιού.....	33
1.13.10 Γαστρεντερικές παθήσεις	33
1.14 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΥΨΕΛΗΣ	34
1.14.1 Γύρη.....	34
1.14.2 Πρόπολη	34
1.14.3 Κερί.....	35
1.14.4 Βασιλικός πολτός	35
1.14.5 Δηλητήριο μέλισσας.....	35
2. ΣΚΟΠΟΣ	36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	37
3.1.1 Γαλάζιο αγκάθι.....	37
3.1.2 Μέλι δάσους	37
3.1.3 Ανθόμελο.....	38
3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	38
3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	38
3.3.1 Κυτταρική σειρά.....	38
3.3.2 Συνθήκες καλλιέργειας.....	39

3.3.3 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των μελιών με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	39
3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	40
3.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.....	40
3.4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (ΤΑC).....	41
3.4.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	42
3.4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	43
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΚΝ45	45
4.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΜΚΝ45 ΚΥΤΤΑΡΑ	46
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

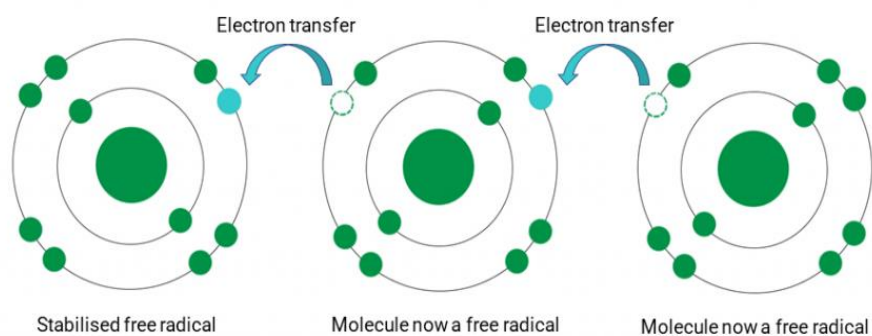
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Για τον όρο «ρίζα» έκανε λόγο για πρώτη φορά Louis-Bernard Guyton de Morveau, ωστόσο χρησιμοποιήθηκε αργότερα από τους Antoine Lavoisier και Moses Gombert από τον οποίο και διατυπώθηκε. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα ιόν, μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια (e^-) στην εξωτερική ηλεκτρονιακή του στοιβάδα και παίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. (Gilbert, 2000)



Εικόνα 1: Σταθερό μόριο και ελεύθερη ρίζα

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από την διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού σε ένα μόριο αλλά και από την προσθήκη ή την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική στοιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas, 1999). Αυτά τα ελεύθερα ηλεκτρόνια καθιστούν πολύ δραστικές τις ελεύθερες ρίζες, καθώς επιτρέπουν την προσέλκυση ηλεκτρονίων από άλλα κοντινά μόρια. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγεί στην δημιουργία νέων ριζών που με την σειρά τους θα μετατρέψουν επόμενα μόρια σε ελεύθερες ρίζες και έτσι δημιουργείται μια αλυσίδα αντιδράσεων (Halliwell & Gutteridge, 1990).

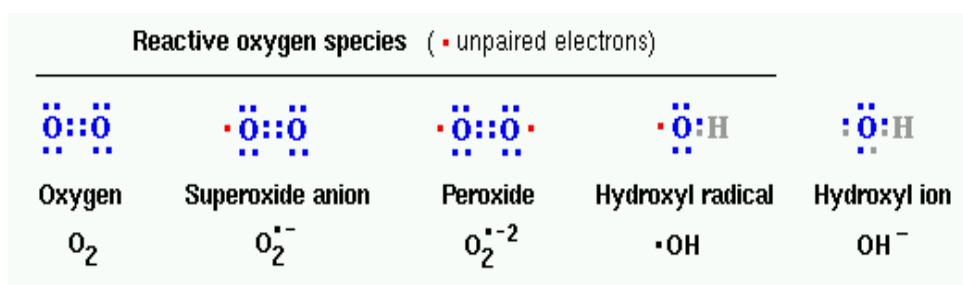


Εικόνα 2: Αλυσίδα αντιδράσεων ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ταξινομηθούν βάσει του κεντρικού ατόμου τους

– κυρίως οξυγόνο αλλά και άζωτο ή θείο. Οι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο αντιπροσωπεύουν την πιο σημαντική κατηγορία ριζικών ειδών που παράγονται σε οργανισμούς και μπορεί να προκαλέσουν βλάβη σε κύτταρα, ιστούς και όργανα καθώς στοχεύουν το DNA, το RNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Mittler, 2017). Από την άλλη πλευρά, οι ελεύθερες ρίζες του αζώτου (RNS) είναι τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού του NO και προκαλούν υπεροξειδωση λιπιδίων που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη (Gholamian-Dehkordi, 2017).

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 (Shararou et al., 2021). Σε αυτήν συμπεριλαμβάνεται η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), η 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 ($^1\text{O}_2$) (Porrag et al., 2017).



Εικόνα 3: Είδη δραστικών μορφών οξυγόνου

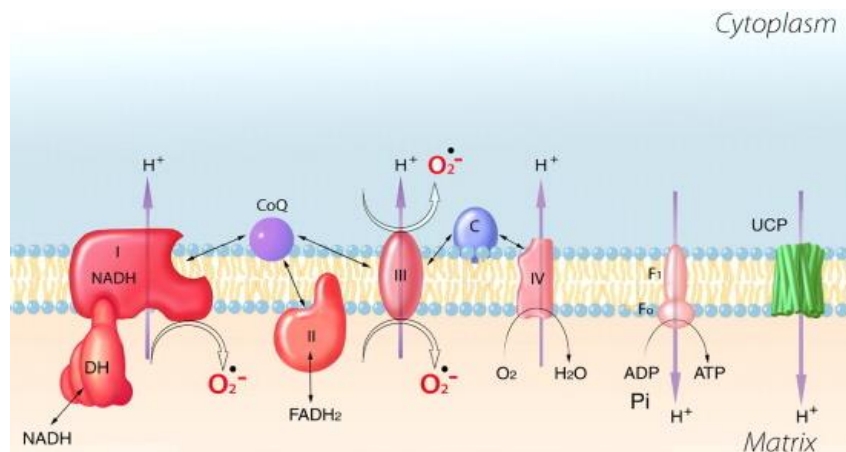
Οι RNS είναι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν άζωτο οι οποίες διαθέτουν υψηλό οξειδωτικό δυναμικό και επομένως εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες. Προκαλούν κυρίως νιτροζυλίωση των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στην δομή και την λειτουργία τους. Τα κύρια RNS περιλαμβάνουν το μονοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) και το διοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}_2^{\cdot-}$) (Bansal & Kaushal, 2014).

1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται ενδογενώς στον οργανισμό αλλά και εξωγενώς. Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είτε μέσω της δράσης ενζύμων είτε όχι αποτελούν παραδείγματα ενδογενών πηγών παραγωγής ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να είναι είτε τελικά προϊόντα αυτών των αντιδράσεων είτε παραπροϊόντα τους.

1.2.1 Οξειδωτική Φωσφορυλίωση

Το μεγαλύτερο ποσοστό οξυγόνου που εισέρχεται στο κύτταρο μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας (οξειδωτική φωσφορυλίωση). Τα ηλεκτρόνια που πα-



Εικόνα 3: Παραγωγή ROS (Balaban et al. 2005)

ράγονται κυρίως από την διάσπαση της γλυκόζης μεταφέρονται μέσω της "αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων" και φτάνουν στο μοριακό οξυγόνο το οποίο ανάγεται σε H_2O . Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελείται από τρία συμπλέγματα πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων i) το σύμπλεγμα NADH διϋδρογενάσης I, ii) το σύμπλεγμα αναγωγάσης κυτοχρώματος c III, iii) το σύμπλεγμα οξειδάσης κυτοχρώματος c και δύο ελεύθερα μόρια, την ουβικινόνη και το κυτόχρωμα c, τα οποία συμβάλλουν στην μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ένα σύμπλεγμα στο άλλο. Ωστόσο, κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων στα συμπλέγματα I και III, διαφεύγουν μικρές ποσότητες μονήρους οξυγόνου (1O_2) και υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), τα οποία όμως εξουδετερώνονται από τοπικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στη θεμέλια ουσία: την υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει μαγνήσιο (MnSOD), η οποία μετατρέπει το υπεροξείδιο σε H_2O_2 , το σύστημα θεωρεδοξίνης-περοξυρεδοξίνης (theoredoxin-peroxyredoxin) 3 και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, τα οποία μετατρέπουν το υπεροξείδιο σε H_2O (Papagalanis, 2014).

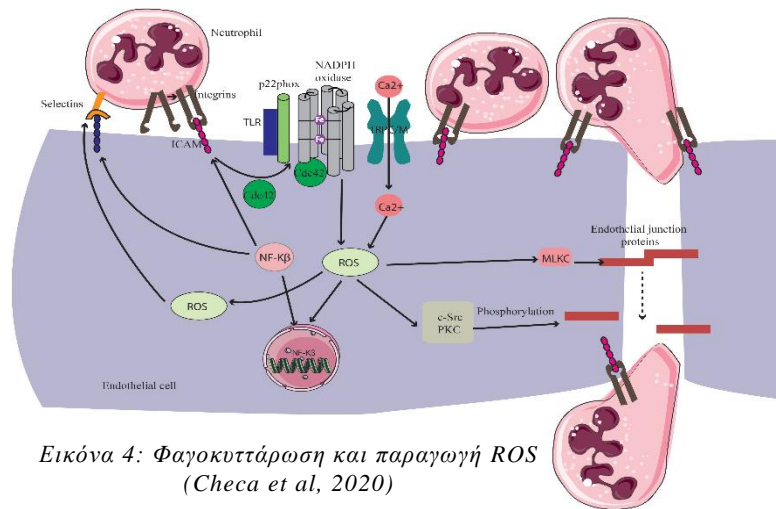
1.2.2 Παραγωγή ελεύθερων ριζών στο κυτταρόπλασμα

Ένα μικρό ποσοστό του H_2O_2 διαφεύγει στο κυτταρόπλασμα και κινητοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω ενζυμικών συστημάτων όπως η NADH-οξειδάση, η οξειδάση του κυτοχρώματος P450, η κυκλοξυγενάση, η ξανθινοξειδάση, και η λιποξυγενάση. Τα παραπάνω ένζυμα μεταφέρουν σταδιακά ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο ώστε να μην το ανάγουν πλήρως αλλά για τη μεταφορά κάθε ηλεκτρονίου σε κάθε στάδιο να παράγεται και ένα ενδιάμεσο προϊόν, δηλαδή $O_2^{\cdot-}$ στο πρώτο

στάδιο και H₂O₂ στο δεύτερο. Ωστόσο επειδή αυτά τα προϊόντα είναι τοξικά για τους ιστούς ο οργανισμός έχει αναπτύξει μηχανισμούς για να ανταπεξέλθει όπως τα ένζυμα της οικογένειας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide dismutase, SOD) που μετατρέπουν το O₂⁻ σε H₂O₂ που τελικά μέσω της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) μετατρέπεται σε νερό (Paragalanis, 2014).

1.2.3 Φαγοκυττάρωση

Εάν ένα φαγοκυτταρικό κύτταρο όπως το ουδετερόφιλο εκτεθεί σε ένα ερέθισμα, έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει το ξένο σωματίδιο και να υφίσταται μια σειρά αντιδράσεων που ονομάζονται «αναπνευστική έκρηξη» (DeCoursey &



Εικόνα 4: Φαγοκυττάρωση και παραγωγή ROS (Checa et al, 2020)

Ligetii, 2005). Η οξειδάση NAD(P)H δρα επί το πλείστο στα ουδετερόφιλα, όπου η παραγωγή O₂ της προκαλεί την «αναπνευστική έκρηξη» που είναι απαραίτητη για την καταστροφή των βακτηρίων. Το σύμπλοκο ενζύμων αποτελείται από δύο συστατικά που συνδέονται με τη μεμβράνη, τα gp91^{phox} και p22^{phox}, τα οποία περιλαμβάνουν το κυτόχρωμα b558, το και το ενεργό κέντρο του ενζυματικού συμπλόκου. Μετά την ενεργοποίηση, τα συστατικά του κυτταροπλάσματος, όπως p47phox, p67phox, p40phox και μικρές G πρωτεΐνες, Rac και Rap1A, μετατοπίζονται στη μεμβράνη για να σχηματίσουν το ενεργό σύμπλοκο. Κατά την φαγοκυττάρωση, παράγεται υπεροξείδιο σε ένα κλάσμα 1-10% που συμμετέχει σε ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης (Valko et al, 2007).

1.2.4 Εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών



Εικόνα 5: Εξωγενείς πηγές ROS

έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή υπεριώδες φως, καθώς και η περιβαλλοντική ρύπανση (π.χ. φυτοφάρμακα) μπορούν να οδηγήσουν σε υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών (Phaniendra et al, 2015).

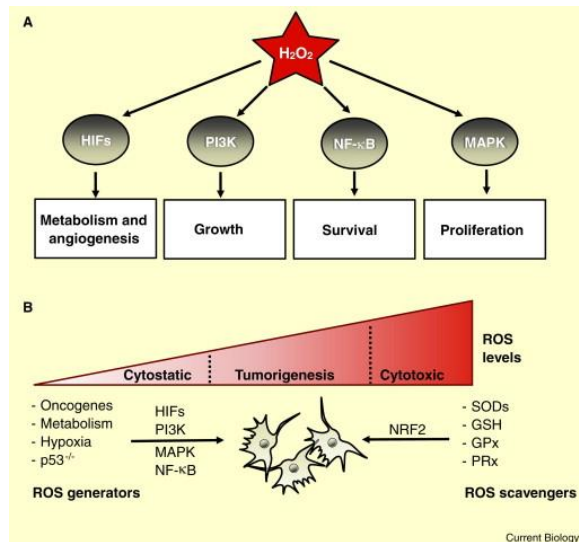
Πέρα από τις ενδογενείς πηγές, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Ενδεικτικά κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι ο τρόπος ζωής, το άγχος, η διατροφή, το κάπνισμα, το αλκοόλ αλλά και ορισμένα φάρμακα. Από την άλλη πλευρά, η μεγάλη

1.3 Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

1.3.1 Θετική επίδραση

Οι ελεύθερες ρίζες λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης για τη ρύθμιση και τη διατήρηση φυσιολογικών λειτουργιών κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης με υπολείμματα κυστεΐνης (Cys). Για παράδειγμα, το H_2O_2 αλληλεπιδρά με τα θειολικά ανιόντα Cys (Cys-S) σε φυσιολογικό pH και τα οξειδώνει στη σουλφονική τους μορφή (Cys-SOH), προκαλώντας δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη-στόχο και αλλάζοντας τη λειτουργία της. Αυτές οι αλλαγές που προέρχονται από οξειδοαναγωγή στη λειτουργία των πρωτεϊνών συχνά επηρεάζουν τη μεταγραφή, τη φωσφορυλίωση και άλλα σημαντικά γεγονότα σηματοδότησης ή/και μεταβάλλουν τις μεταβολικές ροές και τις αντιδράσεις στο κύτταρο αλλάζοντας τις ενζυμικές ιδιότητες (Reczek et al. 2015).

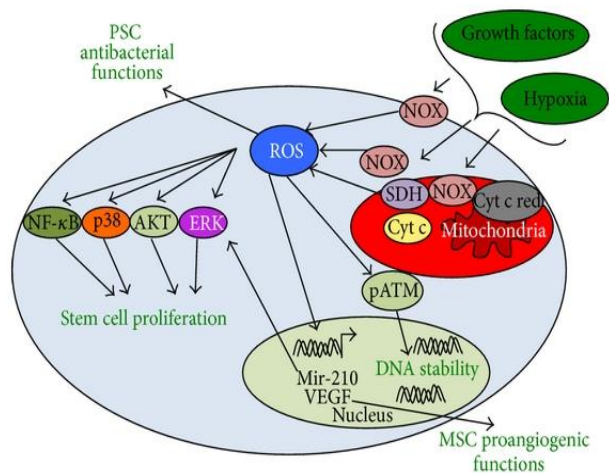
Ένας βασικός ρόλος των ελεύθερων ριζών στην προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής εντοπίστηκε στα καρκινικά κύτταρα τα οποία για να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται, διατηρούν υψηλή συγκέντρωση των ROS μέσω οδών που περιλαμβάνουν παράγοντες που εμπλέκονται στα αποπτωτικά μονοπάτια (HIFs, PI3K, NF-κB, MAPKs) (Schieber et al. 2014).



Εικόνα 6: Δράση H_2O_2

Ένα άλλο παράδειγμα της δράσης των ελεύθερων ριζών στην σηματοδότηση σχετίζεται με την έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Η ενεργοποίηση των surveillance receptors βρέθηκε ότι αυξάνει την παραγωγή ROS που απαιτείται για την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης 1b (IL-1b), του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNFα) και της ιντερφερόνης b (IFN-b), που με τη σειρά τους είναι απαραίτητα για την ανοσολογική απόκριση. Επομένως, τα χαμηλά επίπεδα ROS εμποδίζουν την ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης και οδηγούν σε ανοσοκαταστολή, ενώ τα υψηλά Επίπεδα ROS προκαλούν ανοσία μέσω της αύξησης της απελευθέρωσης προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Mittal et al. 2014).

Η σηματοδότηση των ελεύθερων ριζών βρέθηκε επίσης να παίζει βασικό ρόλο για τα βλαστοκύτταρα. Έτσι, βρέθηκε ότι η χαμηλή συγκέντρωση ελεύθερων ριζών είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, υποστηρίζοντας την ανανέωση και διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων, ενώ η συσσώρευση υψηλών επιπέδων ROS ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης που περιορίζουν την αυτοανανέωση. Επιπλέον, αρκετοί διαφορετικοί τύποι βλαστοκυττάρων βρέθηκαν να βρίσκονται σε περιβάλλον υψηλής οξειδωσης. Φυσικά, η συγκεκριμένη απόκριση οποιουδήποτε συγκεκριμένου

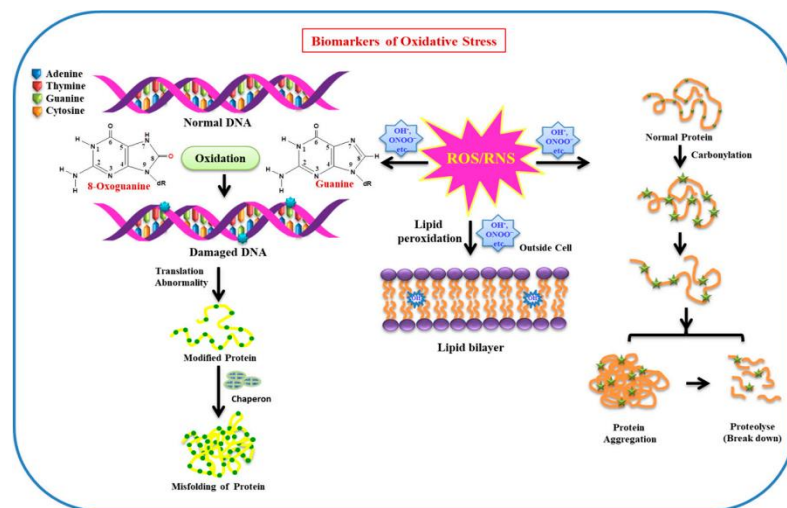


Εικόνα 7: Διαμεσολάβηση των ROS στην σηματοδότηση των βλαστοκυττάρων

ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης που περιορίζουν την αυτοανανέωση. Επιπλέον, αρκετοί διαφορετικοί τύποι βλαστοκυττάρων βρέθηκαν να βρίσκονται σε περιβάλλον υψηλής οξειδωσης. Φυσικά, η συγκεκριμένη απόκριση οποιουδήποτε συγκεκριμένου

τύπου κυττάρου στα επίπεδα ROS εξαρτάται από την ταυτότητά του (Sart et al. 2015).

1.3.2 Αρνητική επίδραση



Εικόνα 8: Επιπτώσεις ελεύθερων ριζών

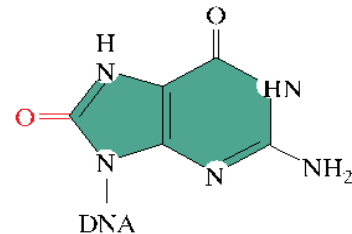
Οι κύριοι στόχοι των ROS ότι είναι το DNA, το RNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Διαφορετικές ελεύθερες ρίζες στοχεύουν διαφορετικά βιομόρια. Τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες μπορούν να τροποποιηθούν λειτουργικά από διάφορα

ROS όπως το OH^\bullet και ONOO^- . Παράλληλα, οι αζωτούχες βάσεις του DNA/RNA είναι επιρρεπείς σε οξειδωτική βλάβη, κυρίως στο μιτοχονδριακό DNA.

- **Υπεροξειδωση των λιπιδίων:** Η υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στον σχηματισμό ενεργών και ασταθών λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτά η τροποποίηση τους μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της ρευστότητας και της ελαστικότητας της κυτταρικής μεμβράνης γεγονός που διευκολύνει την είσοδο των ελεύθερων ριζών στο ενδοκυτταρικό σύστημα προκαλώντας ακόμα τον θάνατο του κυττάρου (Singh et al. 2019; Gaschler & Stockwell, 2017).
- **Βλάβες πρωτεϊνών:** οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν στις πρωτεΐνες προκαλώντας μη αναστρέψιμες βλάβες όπως π.χ. η καρβονυλίωση. Οι καρβονυλικές ομάδες - αλδεΐδες και κετόνες - παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της λυσίνης (Lys), της αργινίνης (Arg), και της θρεονίνης (Thr) οδηγώντας στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν σοβαρές βλάβες τότε δεν διασπώνται και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για

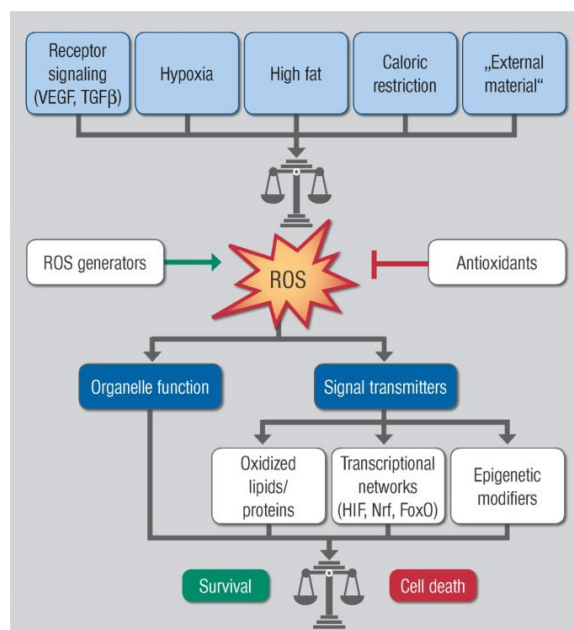
παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα (Chevion et al., 2000).

- Βλάβες του DNA: Η οξειδωτική βλάβη στο DNA προκαλεί σπασίματα στην δίκλωνη έλικα του DNA και αλλοιώσεις στις αζωτούχες βάσεις που εάν δεν επιδιορθωθούν θα οδηγήσουν σε γενετικές ανωμαλίες. Η ρίζα υδροξυλίου (OH^{*}) στοχεύει στην γουανίνη σχηματίζοντας την 8-υδροξυγουανίνη και την αδερίνη, δημιουργώντας την 8-υδροξυαδερίνη (Dizdaroglu et al., 2002).



Εικόνα 9: 8-υδροξυγουανίνη

1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ



Εικόνα 9: Δράσεις ελεύθερων ριζών

Η υπερπαραγωγή ROS οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, δηλαδή στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των οξειδωτικών. Αντίθετα, όταν οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αποκρίσεις όπως στην άμυνα έναντι μολυσματικών παραγόντων, στην κυτταρική σηματοδότηση και την επαγωγή μιτογόνου απόκρισης. Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με αποτέλεσμα να ενισχύεται η οξειδοαναγωγική ομοίωση. (Valko et al. 2007).

Επομένως, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από:

- ο αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών με φυσιολογική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (Halliwell, 2007)

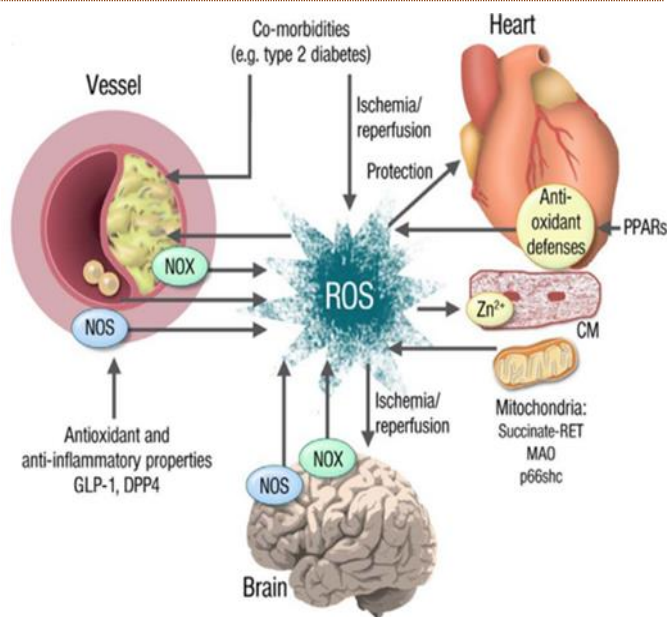
- ο φυσιολογική παραγωγή ελεύθερων ριζών, αλλά μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας (Valko et al. 2007).
- ο συνδυασμό των δύο παραπάνω. (Sies. 2015)

1.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως σε καρδιαγγειακές νόσους, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στον καρκίνο αλλά και στον διαβήτη, γεγονός που αποκαλύπτει τους πολλαπλούς μηχανισμούς με τους οποίους εμπλέκεται στην κυτταρική βλάβη . Ωστόσο, ο βαθμός στον οποίο το οξειδωτικό στρες συμμετέχει στην παθολογία των ασθενειών διαφέρει σημαντικά κατά περίπτωση (Forman et al. 2021).

1.5.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Πολλές μελέτες έχουν δείξει αύξηση των οξειδωμένων λιπιδίων και άλλων δεικτών οξειδωτικού στρες στην αθηροσκλήρωση. Στην αθηροσκλήρωση, η πλάκα συσσωρεύεται στο εσωτερικό στρώμα των αρτηριών και με την πάροδο του χρόνου οι αρτηρίες στενεύουν, οδηγώντας σε έμφραγμα και εγκεφαλικό. Παράλληλα, το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της χοληστερόλης LDL στην



Εικόνα 10: Συμμετοχή των ελεύθερων ριζών στην λειτουργία της καρδιάς, των αγγείων και του εγκεφάλου

οξειδωμένη μορφή της LDL (OxLDL), η οποία ενισχύει την έναρξη και προώθηση της φλεγμονώδους απόκρισης και τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στο σημείο της βλάβης και οδηγεί στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης (Forman et al. 2021).

Οι βιολογικές διεργασίες στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα προκαλούν τη δημιουργία ROS στο καρδιαγγειακό σύστημα. Οι υποτύποι της οξειδάσης NADPH

(NOX) εκφράζονται ευρέως στο καρδιαγγειακό σύστημα - συγκεκριμένα NOX1 (αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα), NOX2 (ενδοθήλιο, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, επιφάνειες και καρδιομυοκύτταρα), NOX4 (ενδοθήλιο, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και καρδιακά βλαστικά κύτταρα κύτταρα), και NOX5 (αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα). Το NOX εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων όπως η υπέρταση, η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Εκτός αυτού, το NOX εμπλέκεται επίσης στην καρδιαγγειακή φυσιολογία, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης και της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η αύξηση του οξειδωτικού στρες οδηγεί σε μονομερισμό της ενδοθηλιακής συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), το οποίο με τη σειρά του προκαλεί περαιτέρω παραγωγή H_2O_2 αντί για NO. Η ανεπάρκεια της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου συμβάλλει στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και στις επακόλουθες καρδιαγγειακές διαταραχές, όπως η υπέρταση (Takahashi et al. 2017).

1.5.2 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson και η νόσος Huntington) χαρακτηρίζονται από απόπτωση/νέκρωση και δυσλειτουργία των νευρώνων, που οδηγεί σε κακοήθη επίδραση στο νευρικό σύστημα. Ο εγκέφαλος περιέχει συγκεκριμένα οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα (χαλκός και σίδηρος) που συμμετέχουν ενεργά στη δημιουργία ROS. Παράλληλα, οι κυτταρικές μεμβράνες του εγκεφάλου είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι ευαίσθητα στην υπεροξείδωση (Singh et al. 2019).

1.5.3 Ψυχιατρικές ασθένειες

Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει αρκετές μελέτες που συσχετίζουν τις ελεύθερες ρίζες με τις ψυχικές ασθένειες (Ng et al. 2008). Στις περισσότερες μελέτες έγινε μεταθανάτια ανάλυση εγκεφάλου σχιζοφρενών ασθενών και παρατηρήθηκαν (i) αυξημένοι δείκτες οξειδωτικών τροποποιήσεων των βιομορίων, (υπεροξείδωση λιπιδίων, οξείδωση DNA, καρβονυλίωση πρωτεϊνών). (ii) μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης, (iii) μικρογλοίωση, αστρογλοίωση και αύξηση των δεικτών ενεργοποίησης μικρογλοίας (Egea et al. 2017).

1.5.4 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που ορίζεται από τουλάχιστον τρία στάδια: έναρξη, προώθηση και εξέλιξη. Το οξειδωτικό στρες αλληλοεπιδρά και με τα τρία στάδια αυτής της διαδικασίας. Κατά τη διάρκεια του σταδίου έναρξης, τα αυξημένα επίπεδα ROS μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στο DNA εισάγοντας γονιδιακές μεταλλάξεις και δομικές αλλοιώσεις. Στο στάδιο της προώθησης, οι ROS μπορεί να συμβάλουν στην ανώμαλη γονιδιακή έκφραση, στην απόφραξη της επικοινωνίας κυττάρου σε κύτταρο και στην τροποποίηση των συστημάτων δεύτερου αγγελιοφόρου, οδηγώντας έτσι σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή μείωση της απόπτωσης του αρχικού πληθυσμού κυττάρων. Τέλος, το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να συμμετέχει στο στάδιο εξέλιξης της διαδικασίας του καρκίνου προσθέτοντας περαιτέρω αλλοιώσεις του DNA στον πληθυσμό των κυττάρων που έχουν ξεκινήσει (Reuter et al. 2010).

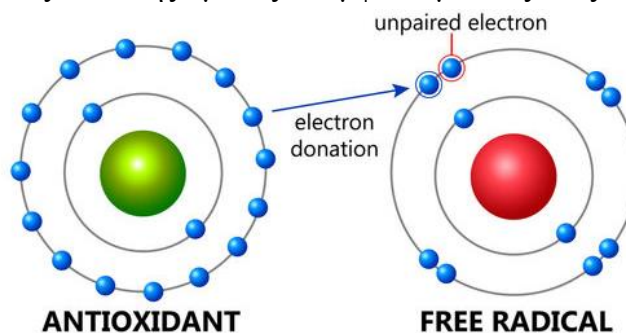
1.5.5 Σακχαρώδης διαβήτης

Η οξειδωτική βλάβη στα β-κύτταρα του παγκρέατος που προκαλείται από το ROS ως αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας επηρεάζει την ποσότητα και την ποιότητα της εκκρινόμενης ινσουλίνης. Η υπερβολική παραγωγή ROS στα β-κύτταρα μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στο σχήμα, τον όγκο και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, γεγονός που συμβάλλει στην αποσύνθεση των εξαρτώμενων από το ATP διαύλων K^+ και στην εξασθενημένη έκκριση ινσουλίνης.

Παράλληλα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να διαδραματίσει διπλό ρόλο στον σακχαρώδη διαβήτη, συμβάλλοντας όχι μόνο στην εκδήλωσή του, αλλά και στην κλιμάκωση της νόσου και των σχετικών επιπλοκών. Το ROS μπορεί να ενεργοποιήσει πολλές άλλες οδούς, οι οποίες, με τη σειρά τους, προκαλούν μία από τις κύριες επιπλοκές του διαβήτη όπως τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Darenskaya et al. 2021).

1.6 ANTIOΞEIDΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Ο οργανισμός καταφέρνει να αμύνεται στα υψηλά επίπεδα των ελεύθερων ριζών, μέσω ενός συστήματος αντιοξειδωτικής άμυνας. Σύμφωνα με τους Halliwell και Gutteridge, αντιοξειδωτικό είναι «κάθε ουσία που καθυστερεί, αποτρέπει ή αφαιρεί την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» Τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο



Εικόνα 11: Δράση αντιοξειδωτικών μορίων

που απαιτείται για την δημιουργία του ζεύγους μετατρέποντας την ρίζα σε αδρανές μόριο. Αυτό συνήθως έχει ως συνέπεια την μετατροπή του αντιοξειδωτικού σε ρίζα που μετέπειτα διμερίζεται και αδρανοποιείται (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα αποτελείται από ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διαχωρίζονται επιμέρους σε ενζυμικά όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη (GSH), οι βιταμίνες C και E. Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν τα μικροθρεπτικά συστατικά και άλλα εξωγενώς χορηγούμενα αντιοξειδωτικά (Halliwell, 2007).

1.6.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι μόρια που παράγονται από τον οργανισμό και έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Τα κύρια ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι:

- Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD): μετατρέπει το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο. (Fukai et al. 2011)
- Καταλάση: μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό (Forman et al. 2009)
- Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx): αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλων υπεροξειδίων, προς νερό και προς αλκοόλες (Brigelius-Flohé et al. 2013)Βιταμίνες E και C: μεταφέρει το υδρογόνο της σε μια ελεύθερη ρίζα υπεροξυλίου ενός υπεροξειδωμένου λιπαρού οξέος, σπάζοντας έτσι την αλυσιδωτή αντίδραση και αποτρέποντας την υπεροξείδωση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης (Traber et al. 2020).

- Γλουταθειόνη: ως κύριο συστατικό του κυτταρικού αντιοξειδωτικού συστήματος, η GSH έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: (i)στη διατροφή μπορεί να απορροφηθεί εν μέρει από το λεπτό έντερο και μπορεί να συντεθεί de novo, έτσι ώστε η GSH να είναι ένα εξωγενές και ενδογενές αντιοξειδωτικό, (ii) αν και η ρίζα γλουταθειόνης ($GS\bullet$) που σχηματίζεται από την οξειδωση της GSH είναι μια προ-οξειδωτική ρίζα, η $GS\bullet$ μπορεί να αντιδράσει με ένα άλλο $GS\bullet$ για να δώσει GS-SG, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε GSH, (iii) η GSH μπορεί να αντιδράσει με μια ποικιλία ξενοβιοτικών ηλεκτρόφιλων ενώσεων, (iv) η GSH εξουδετερώνει αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες άμεσα και έμμεσα μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, (v) η GSH αλληλεπιδρά με τη θειορεδοξίνη και η γλουταρεδοξίνη, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της κυτταρικής οξειδοαναγωγής. (Meister et al. 2018)

1.6.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Πολλές φορές τα ενδογενή αντιοξειδωτικά δεν επαρκούν για την άμυνα του οργανισμού με αποτέλεσμα να καθίσταται απαραίτητη η λήψη αντιοξειδωτικών. Κύριες πηγές εξωγενών αντιοξειδωτικών είναι μία διατροφή που περιλαμβάνει φρούτα, λαχανικά, όσπρια, τσάι ή καφέ αλλά και επιπρόσθετα συμπληρώματα διατροφής εμπλουτισμένα με αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνες C και E (Veskoukis et al. 2018).

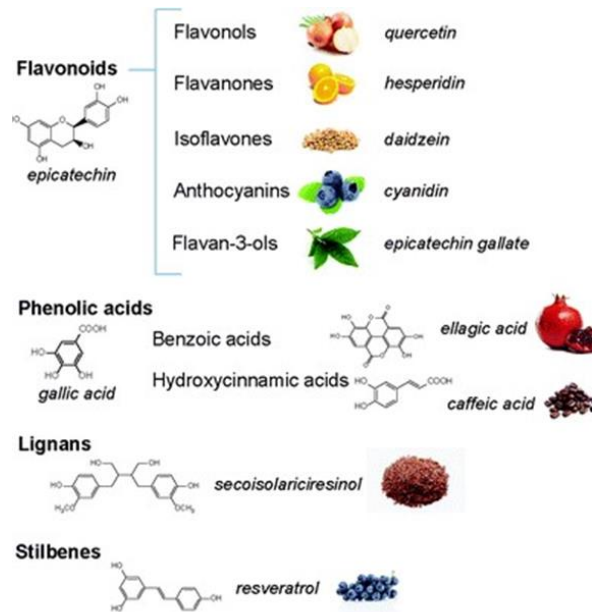
1.7 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια χημικά ετερογενής ομάδα φυτοχημικών, με περίπου 10.000 ενώσεις, οι οποίες ομαδοποιούνται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή. Χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: τα μη φλαβονοειδή (φαινολικό οξύ) και φλαβονοειδή (φλαβανόλες φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονόνες, ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες). Αυτές οι ενώσεις έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες στις δομές τους, οι οποίες μπορεί να ποικίλλουν από ένα απλό έως ένα πολύπλοκο μόριο φαινολικό πολυμερές υψηλού μοριακού βάρους (Missio da Silva et al. 2016). Οι κατηγορίες πολυφαινολών είναι οι εξής:

- Φαινολικά οξέα: απαντώνται κυρίως στο σιτάρι αλλά και σε άλλα δημητριακά
- Φλαβανόλες: βρίσκονται στα φρούτα, το κρεμμύδι, το μπρόκολο, το κακάο

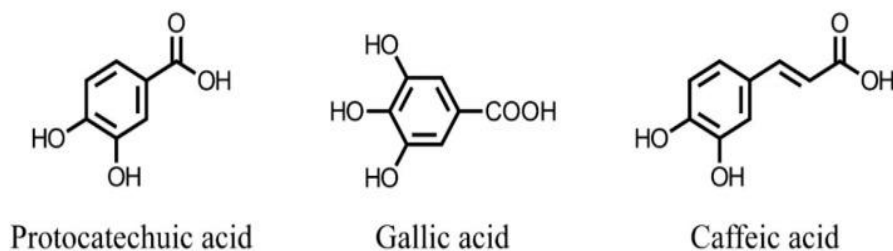
αλλά και το πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί

- **Φλαβόνες:** εντοπίζονται κυρίως σε μυρωδικά όπως το θυμάρι, το σέλινο και τον μαϊντανό αλλά και στα δημητριακά
- **Φλαβονόλες:** βρίσκονται κυρίως στο μήλο και το πράσινο τσάι
- **Φλαβονόνες:** απαντώνται στα εσπεριδοειδή
- **Ανθοκυανιδίνες:** εμπεριέχονται σε φρούτα και λαχανικά με κόκκινο ή μπλε χρώμα όπως τα μούρα, τα σταφύλια αλλά και στο μαύρο τσάι
- **Ισοφλαβόνες:** βρίσκονται κυρίως στα όσπρια και την σόγια
- **Λιγνάνες:** εντοπίζονται στα δημητριακά, τις φράουλες, τα βερίκοκα, το λάχανο και το μπρόκολο
- **Στιλβένια:** απαντώνται στα σταφύλια, τα βατόμουρα και τα αμύγδαλα (Rahman et al. 2018)



Εικόνα 12: Πολυφαινόλες

Τα φαινολικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο υποομάδες ανάλογα με τη δομή τους: τα υδροξυβενζοϊκά και τά υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα έχουν δομή C1–C6 και προέρχονται από το βενζοϊκό οξύ. Οξέα που προέρχονται από υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι το βανιλικό οξύ, το σαλικυλικό (2-υδροξυβενζοϊκό) οξύ και το γαλλικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα έχουν δομή C3–C6 και είναι το κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ. Αυτές οι ενώσεις απαντώνται συνήθως συζευγμένες και σχηματίζονται ως εστέρες όπως το τρυγικό οξύ.



Εικόνα 13: Χημικοί τύποι φαινολικών ενώσεων

Τα φλαβονοειδή έχουν πυρηνική δομή C6–C3–C6, και αποτελούνται από δύο

βενζολικούς δακτυλίους που συνδέονται με έναν δακτύλιο πυρανίου. Αντιπροσωπεύουν η μεγαλύτερη ομάδα φυτικών φαινολικών ενώσεων, που αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 50% όλων των φυσικών φαινολικών ενώσεων (Crozier et al. 2006).

Οι φυτικές φαινόλες μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες για να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρόφιλες υδροκινόνες και κινόνες (Forman et al. 2014). Ωστόσο, βρίσκονται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις μέσω της ενίσχυσης της προ-οξειδωτικής τους φύσης. Επίσης έχει αποδειχθεί τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις και τιμές pH ή παρουσία σιδήρου μπορούν να ξεκινήσουν τη διαδικασία αυτοοξειδωσης και να μετατραπούν σε προ-οξειδωτικά ή ακόμη και να προκαλέσουν τοξικότητα. Επιπλέον, παράγοντες όπως η δόση, η διέλευση και ο χρόνος χορήγησης, η συγκέντρωση και η βιοδιαθεσιμότητα παίζουν καθοριστικούς ρόλους στην εκδήλωση της *in vivo* συμπεριφοράς των πολυφαινολικών ενώσεων (Veskoukis et al. 2018).

1.8 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΜΕΛΙΟΥ

Πολλές ιστορικές πηγές αναφέρουν τις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού. Μια πλάκα των Σουμερίων (6200 π.Χ.), καταγράφει τη θεραπεία ενός δερματικού έλκους με μέλι. Ο πάπυρος του Ebers του 1550 π.Χ. περιγράφει 147 συνταγές που περιέχουν μέλι για χρήση στη φαλάκρα, τα οιδήματα, την φλεγμονή αλλά και ως υλικό επιδέσμου μετά από χειρουργική επέμβαση. Ο Αριστοτέλης (384–322 π.Χ.) και ο Ιπποκράτης (460-357 π.Χ.) αναφέρουν τη χρήση μελιού για τη θεραπεία πλήθους ασθενειών, πληγών και ερεθισμένων ματιών (Nikhat & Fazil. 2022). Παράλληλα, το μέλι χρησιμοποιήθηκε από τους αρχαίους Αιγύπτιους και κλασικούς πολιτισμούς (Ελληνες και Ρωμαίους σε φαρμακευτικά ή καλλυντικά σκευάσματα ή ως ταριχευτική ουσία (Martinello & Mutinelli. 2021). Κατά τον Μεσαίωνα, (8ος-13ος αιώνας μ.Χ.), οι Άραβες διέδωσαν την χρήση του μελιού, ως βάση των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων και καλλυντικών, όπως αναφέρεται και στο Κοράνι (Bell SG. 2007).

Στην Αναγέννηση (14ος-17ος αιώνας), το μέλι ήταν δημοφιλές ως βαφή μαλλιών, ενυδατική κρέμα και μάσκα προσώπου. Ως γλυκαντικό, χρησιμοποιούνταν ευρέως μέχρι το 1800 μ.Χ., αλλά αργότερα η χρήση του μειώθηκε λόγω της αυξημένης βιομηχανικής παραγωγής ζάχαρης (Kuropatnick et al. 2018). Ωστόσο, τον 20ό αιώνα εμφανίστηκε τεράστια αύξηση στις φαρμακευτικές χρήσεις του μελιού καθώς διάφορες

επιστημονικές μελέτες έχουν αναφέρει αντιμικροβιακές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφόρων τύπων μελιού (Nikhat & Fazil. 2022).

1.9 APIS MELLIFERA

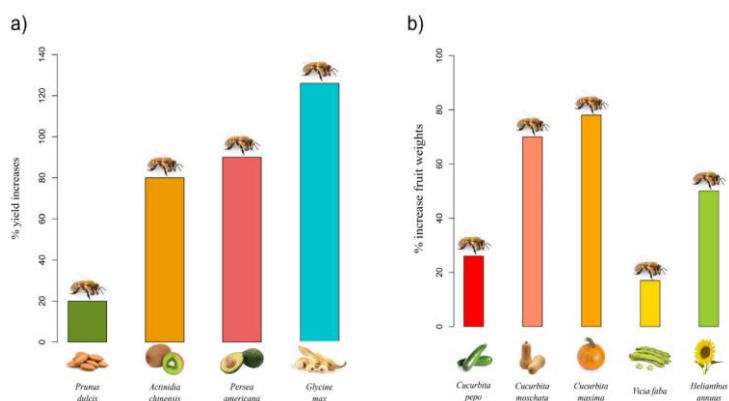
Στην Ευρώπη, το βρώσιμο μέλι παράγεται αποκλειστικά από την *Apis mellifera*.

Οι μέλισσες επισκέπτονται εκατοντάδες λουλούδια όπου μηρυκάζουν το νέκταρ και τα πεπτικά ένζυμα του στομάχου διασπούν τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Στην συνέχεια, αυτό το μείγμα μεταφέρεται στην επόμενη μέλισσα και διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (για περίπου 20 λεπτά) μέχρι το νέκταρ να μετατραπεί πλήρως σε μέλι. Τέλος, οι μέλισσες αφήνουν το μέλι στην κυψέλη και χτυπούν τα φτερά τους για να στεγνώσει (Ramsay et al. 2019).



Εικόνα 14: *Apis mellifera*

Η επικονίαση των μελισσών παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των οικοσυστημάτων. Οι μέλισσες τρέφονται με νέκταρ και γύρη και μπορούν να μεταφέρουν κόκκους γύρης στο στίγμα του λουλουδιού, διευκολύνοντας έτσι τη γονιμοποίηση. Παράλληλα, οι μέλισσες επηρεάζουν και τα χαρακτηριστικά των φυτών. Για παράδειγμα, η επικονίαση προκαλεί Αύξηση της απόδοσης στις καλλιέργειες αμυγδάλου, ακτινιδίου, αβοκάντο και σόγιας. Αλλά και αύξηση του βάρους των καρπών σε φάβα και ηλίανθο (Para et al. 2022).



Εικόνα 15: Τα οφέλη στην απόδοση των φυτών (Para et al. 2022)

1.10 ΕΙΔΗ ΜΕΛΙΟΥ

Το μέλι ορίζεται ως «η φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από τις μέλισσες *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις εντόμων, οι οποίες το συλλέγουν, το μεταβάλλουν με την βοήθεια συγκεκριμένων ουσιών και ντο αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους».

Το μέλι κατηγοριοποιείται ανάλογα με την βοτανική του προέλευση και μπορεί να χαρακτηριστεί ως μονοανθικό ή πολυανθικό. Σε κανονικές συνθήκες παραγωγής, μονοανθικό μέλι δεν μπορεί να προκύψει, ακόμα κι αν ένα βοτανικό είδος μπορεί να κυριαρχεί (Schievano et al., 2016). Ωστόσο, ως μονοανθικό χαρακτηρίζεται το μέλι που περιέχει πάνω από 51% νέκταρ από ένα συγκεκριμένο φυτό, ενώ τα πολυανθικά μέλια χαρακτηρίζονται από το φυτό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ο χαρακτηρισμός των ειδών γίνεται μέσω της γυροσκοπικής ανάλυσης όπου προσδιορίζεται το είδος των γυρεόκοκκων και η βοτανική προέλευση (Becerril-Sánchez et al. 2021).

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης είναι ανάλογα με το αν το μέλι έχει μελίτωμα. Ως μέλι μελιτώματος χαρακτηρίζεται εκείνο που αποτελείται από ένα μείγμα νέκταρ και εκκρίσεων των εντόμων και αποτελεί την πλεονάζουσα ποσότητα του χυμού του φυτού, την οποία το έντομο δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει. Αυτός ο τύπος μελιού είναι συχνά πλουσιότερος σε θρεπτικά συστατικά από το μέλι νέκταρ (Khalil et al. 2012).

1.11 ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΛΙΟΥ

Το μέλι είναι μια φυσική τροφή που περιέχει περίπου 200 ουσίες, κυρίως σάκχαρα, ένζυμα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνες, μέταλλα και αρωματικές ουσίες. Η σύνθεση, το χρώμα, το άρωμα και η γεύση του μελιού εξαρτώνται κυρίως από τα άνθη, την τοποθεσία, το κλίμα και τους υπότυπους των μελισσών (π.χ. *Apis mellifera cecropia*, *Apis mellifera ligustica*) που συμμετέχουν στην παραγωγή του, και είναι επίσης επηρεάζεται από καιρικές συνθήκες, επεξεργασία, χειρισμό, συσκευασία και χρόνο αποθήκευσης (Missio da Silva et al., 2015).

1.11.1 Σάκχαρα

Οι μονοσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν περίπου το 75% των σακχάρων που βρί-

σκονται στο μέλι, μαζί με 10–15% δισακχαρίτες και μικρές ποσότητες άλλων σακχάρων. Η συγκέντρωση της φρουκτόζης και της γλυκόζης, αλλά και η αναλογία τους, είναι δείκτες ταξινόμησης των μονοανθικών μελιών. Σχεδόν σε όλα τα είδη μελιού, η φρουκτόζη είναι το σάκχαρο με την μεγαλύτερη αναλογία. Άλλα σάκχαρα που περιέχονται στο μέλι είναι σακχαρόζη, ραμνόζη, τρεχαλόζη, ισομαλτόζη, μαλτόζη, μαλτοτετραόζη, μαλτοτριόζη, μαλτουλόζη, μελεζιτόζη και η ραφινόζη (de la Fuente et al. 2011).

Η σακχαρόζη αποτελείται από ένα μόριο φρουκτόζης και ένα μόριο γλυκόζης και υδρολύεται από το ένζυμο ιμπερτάση, δίνοντας ισομοριακό μείγμα εξοζών. Η μαλτοτριόζη αποτελείται από τρεις μόρια γλυκόζης που υδρολύεται σε μαλτόζες και εν συνεχεία η μαλτόζη υδρολύεται από την γλυκοσιδάση σε δύο μόρια γλυκόζης (Soldatkin et al. 2013).

1.11.2 Πρωτεΐνες

Η προέλευση των πρωτεϊνών στο μέλι μπορεί είναι τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης. Η κύρια πηγή είναι το νέκταρ των φυτών ωστόσο το μέλι εμπλουτίζεται και από τις εκκρίσεις και τα υγρά των σιελογόνων αδένων και του φάρυγγα των μελισσών.

Τα αμινοξέα αποτελούν το 1% (w/w) των συστατικών του μελιού και οι σχετικές αναλογίες τους εξαρτώνται από την προέλευση του μέλι (νέκταρ ή μελίτωμα). Το αμινοξύ που συναντάται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο μέλι και τη γύρη είναι η προλίνη και έπειτα ακολουθούν όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα. Η προλίνη προέρχεται τις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων (*Apis mellifera* L.) κατά τη μετατροπή του νέκταρ σε μέλι. Η προλίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για την αξιολόγηση της ωρίμανσης του μελιού και σε ορισμένες περιπτώσεις νοθείας με ζάχαρη. (Hermosín et al., 2003).

Ένα μικρό ποσοστό των πρωτεϊνών του μελιού είναι ένζυμα όπως η ιμπερτάση, η α -και β -γλυκοσιδάση, η καταλάση, η όξινη φωσφατάση, η διαστάση και η οξειδάση της γλυκόζης. Οι διαστάσεις είναι μια ομάδα αμυλολυτικών ενζύμων που περιλαμβάνουν α - και β -αμυλάσες που υδρολύουν την αλυσίδα του αμύλου σε dextrin και μαλτόζη αντίστοιχα. Από την άλλη, η οξειδάση της γλυκόζης μετατρέπει τη γλυκόζη σε d-γλυκονολακτόνη, η οποία υδρολύεται σε γλυκονικό οξύ. Εκτός από τη γλυκονολακτόνη, η οξειδάση της γλυκόζης παράγει επίσης υπεροξειδίο του υδρογόνου, που έχει βακτηριοκτόνο δράση (Moreira et al. 2007).

1.11.3 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα του μελιού βρίσκονται σε ποσοστό 0,57% και προέρχονται από την διάσπαση των σακχάρων από τα ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες κατά την μετατροπή του νέκταρ σε μέλι. Αυτά τα οξέα σχετίζονται με το χρώμα και τη γεύση του μελιού αλλά και με τις χημικές του ιδιότητες όπως η οξύτητα, το pH και η ηλεκτρική αγωγιμότητα (Mato et al., 2006). Το κυρίαρχο οργανικό οξύ στο μέλι είναι το γλυκονικό οξύ που προκύπτει από την δράση της οξειδάσης της γλυκόζης. Άλλα οξέα που βρίσκονται στο μέλι είναι οξικό, μυρμηκικό, βουτυρικό, πυρογλουταμικό, κιτρικό, γαλακτικό, μηλικό, προπιονικό, βαλερικό, καπρικό, παλμιτικό και ηλεκτρικό. Παράλληλα, τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στις οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα και η γεύση ως συστατικά των τροφίμων (Jurado-Sánchez et al. 2011).

1.11.4 Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει μικρή ποσότητα βιταμινών, ιδιαίτερα του συμπλέγματος βιταμινών B, που προέρχονται από τους κόκκους γύρης σε εναιώρημα. Οι βιταμίνες που περιέχονται στο μέλι περιλαμβάνουν θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), νικοτινικό οξύ (B3), παντοθενικό οξύ (B5), πυριδοξίνη (B6), βιοτίνη (B8 ή H), φολικό οξύ (B9) και το ασκορβικό οξύ (C) και διατηρούνται λόγω του χαμηλού pH του μελιού. Η βιταμίνη C βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα είδη μελιού και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του. Η εμπορική διήθηση του μελιού μπορεί να προκαλέσει μείωση της περιεκτικότητας σε βιταμίνες λόγω της πλήρους απομάκρυνσης της γύρης (Bonté & Desmoulière, 2013).

1.11.5 Ιχνοστοιχεία

Το μέλι περιλαμβάνει πλήθος μακροθρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχεία όπως κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρος, φώσφορος, νάτριο, μαγγάνιο, ιώδιο, ψευδάργυρος, λίθιο, νικέλιο, κάδμιο, χαλκός, βάριο, χρώμιο, σελήνιο και αρσενικό. Η περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία στο μέλι κυμαίνεται από 0,04% στα ανοιχτόχρωμα μέλια σε 0,2% στα σκούρα μέλια. Το μέλι αντανakλά τα χημικά συστατικά των φυτών από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν το μέλι, άρα η περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία

που υπάρχουν στο μέλι εξαρτάται από τον τύπο του εδάφους στο οποίο ήταν το φυτό και το νέκταρ βρέθηκε και μπορεί να υποδηλώνει τη βοτανική προέλευση ενός συγκεκριμένου μελιού. Το κάλιο είναι το πιο άφθονο στοιχείο, που αντιστοιχεί γενικά στο ένα τρίτο της συνολικής περιεκτικότητας σε μέταλλα που βρίσκεται στο μέλι ενώ σε μικρότερες ποσότητες εντοπίζονται επίσης νάτριο, σίδηρο, χαλκό, πυρίτιο, μαγγάνιο, ασβεστίου και μαγνησίου (Alqarni et al., 2014).

Τα ιχνοστοιχεία επιτελούν μια θεμελιώδη λειτουργία στα βιολογικά συστήματα: διατήρηση των φυσιολογικών αποκρίσεων, ρύθμιση του μεταβολισμού, του κυκλοφορικού συστήματος και του αναπαραγωγικού συστήματος. Ωστόσο υπάρχουν και ορισμένα βαρέα μέταλλα, όπως το αρσενικό, ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο, είναι τοξικά εάν ξεπεραστεί το μέγιστο όριο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) έχουν προταθεί ως αποδεκτά επίπεδα τα εξής: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το αρσενικό, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τον μόλυβδο, 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τον υδράργυρο και 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το κάδμιο.

1.11.6 Πτητικές ενώσεις

Η γεύση του μελιού επηρεάζεται από πτητικές ενώσεις, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ, τις συνθήκες επεξεργασίας, την προέλευση αλλά και τον τρόπο αποθήκευσης. Παράλληλα, οι μέλισσες μπορούν επίσης να παράγουν ή μετατρέπουν φυτικά συστατικά σε άλλες ενώσεις με πτητικές ιδιότητες. Οι δικετόνες, οι θειούχες ενώσεις και τα αλκάνια είναι χαρακτηριστικά του μελιού ευκαλύπτου, ενώ η εξανάλη και η επτανάλη είναι οι κύριες ενώσεις στο άρωμα των μελιών λεβάντας (Barra et al. 2012).

1.11.7 Φαινολικές ενώσεις

Τα φυτά έχουν πολλά πολυφαινολικά παράγωγα και όταν οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ, αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να μεταφερθούν από τα φυτά στο μέλι. Τα κύρια λειτουργικά συστατικά του μελιού είναι τα φλαβονοειδή και μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη συνολική αντιοξειδωτική δράση του μέλι, επιφέροντας ευεργετικά αποτελέσματα για την ανθρώπινη υγεία (Missio da Silva et al. 2016).

Οι κύριες πολυφαινόλες του μελιού είναι οι εξής: βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, συριγγικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, κερκετίνη, καμφερόλη, μυρικετίνη, 3-

υδροξυβενζοϊκό οξύ, γλωρογενικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, μαρινικό οξύ, γαλλικό οξύ, εσπερετίνη, βενζοϊκό οξύ και άλλα.

1.12 ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΜΕΛΙΟΥ

Μετά από υψηλή θερμοκρασία ή/και μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης, το μέλι μπορεί να αλλάξει και να αποικοδομηθεί σε νέα προϊόντα όπως φουράνια, αμινοξέα, αλκοόλες και νέες φαινολικές και πτητικές ενώσεις μέσω της αντίδρασης του καρβοξυλικής ομάδας στο αναγωγικό άκρο των σακχάρων και των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών (αντίδραση Maillard). Τέτοια αμινοξέα είναι η λυσίνη, η προλίνη και η αργινίνη. Αυτές οι αλλαγές στα αμινοξέα προκαλούν την δημιουργία τοξικών ουσιών.

Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (5-HMF), η οποία είναι προϊόν αντίδρασης, μπορεί να σχηματιστεί όταν το μέλι υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία ή μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης (Tomuk et al., 2013), γίνεται πτητικό και τοξικό, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του. Επιπλέον, το 5-HMF μπορεί επίσης να σχηματιστεί με την αφυδάτωση των σακχάρων σε ένα όξινο περιβάλλον, όπως το μέλι (Barra et al. 2012). Άλλα προϊόντα αποικοδόμησης, όπως το 2-ακετυλοφουράνιο, η ισομαλτόλη και η μαλτόλη σχηματίζονται όταν υποβάλλονται σε θερμότητα παρουσία αμινοξέων, συμβάλλοντας στην αλλαγή του χρώματος, της γεύσης και της οσμής του μελιού.

Οι Iglesias et al. (2006) ανέλυσαν τα αμινοξέα διαφορετικών μειγμάτων νέκταρ, μελιτώματος και μελιού που αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και δεν είναι παστεριωμένο για 24 μήνες. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα κάποιων αμινοξέων (ασπαρτικό οξύ, β-αλανίνη, προλίνη) αυξήθηκε κατά τους πρώτους 6 μήνες αποθήκευσης. Η συγκέντρωση προλίνης μειώθηκε τους επόμενους 6 μήνες αποθήκευσης, η συγκέντρωση του ασπαρτικού οξέος μειώθηκε τους επόμενους 12 μήνες από αποθήκευση ενώ η συγκέντρωση της β-αλανίνης δεν άλλαξε μεταξύ 6 και 24 μηνών. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να υποδηλώνει ότι ενώ η β-αλανίνη εμπλέκεται στην αντίδραση Maillard, η αντιδραστικότητά του είναι χαμηλότερη από αυτή άλλων αμινοξέων. Η αύξηση του ασπαρτικού οξέος και της προλίνης κατά τους πρώτους μήνες αποθήκευσης μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία ενζύμων όπως πρωτεάση και πεπτιδάση, επειδή αυτά τα αμινοξέα υπάρχουν στη γύρη (Iglesias et al., 2006).

Το μέλι χρησιμοποιείται ευρύτατα και για το λόγο αυτό απαιτεί ορισμένα πρότυπα που εγγυώνται την ταυτότητα και την ποιότητά του έτσι ώστε οι καταναλωτές να μπορούν να το καταναλώνουν με ασφάλεια, και το ίδιο πρέπει έχουν ελεύθερη κυκλοφορία στην εσωτερική αγορά και πρόσβαση στην εξωτερική αγορά (Codex Standard for Honey, 2001). Η πιο κοινή μορφή παραποίησης μελιού είναι η προσθήκη φθηνών γλυκαντικών (όπως ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο ή ραφινάρισμαμένη ζάχαρη από τεύτλα, σιρόπι καλαμποκιού, υψηλή φρουκτόζη ή σιρόπι μαλτόζης) και μέλισσες που τρέφονται με σακχαρόζη (Magdas et al., 2021).

1.13 ΜΕΛΙ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

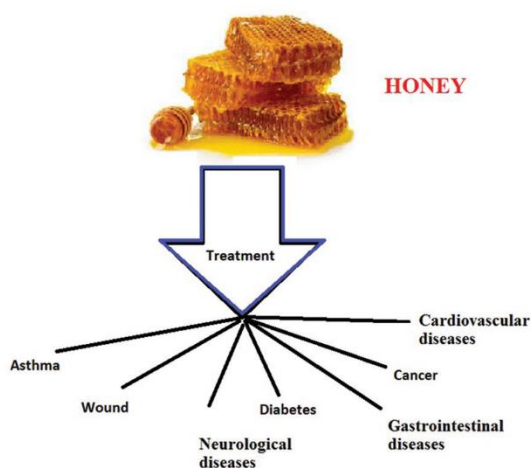
Στοιχεία δείχνουν ότι το μέλι μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία τόσο ως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδες, αντιβακτηριακή, αντιδιαβητική ουσία.

1.13.1 Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού

Το μέλι αντιπροσωπεύει ένα φυσικό προϊόν που δεν έχει παρενέργειες που μπορεί να είναι επιβλαβείς στην υγεία. Στο μέλι περιέχονται ενώσεις όπως η βιταμίνη C, η καταλάση, υπεροξειδάσες αλλά και φλαβονοειδή και καροτινοειδή που είναι ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Khalil et al. 2010)

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά του μελιού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, καταπολεμώντας τις βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες, συγκεκριμένα μειώνοντας τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων, καρκίνου, διαταραχής του ανοσοποιητικού συστήματος κλπ (Džugan et al. 2018).

Παράλληλα, έχει συσχετιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα με το χρώμα του μελιού. Σκουρόχρωμα μέλια, όπως μέλι από φαγόπυρο και ερείκη που έχουν χαρακτηριστικά σκούρο καφέ, σχεδόν μαύρο χρώμα διαθέτουν υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών και μπορούν να μειώσουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το ROS (Pătruică et al. 2022)



Εικόνα 16: Η επίδραση του μελιού σε ασθένειες

1.13.2 Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού

Το μέλι παρουσιάζει ένα πλήθος φυσικών ιδιοτήτων που το καθιστούν αποτελεσματικό στην καταπολέμηση μικροβίων. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι το χαμηλό ποσοστό υγρασίας, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και το χαμηλό pH.

- Το χαμηλό ποσοστό υγρασία περιορίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών δεδομένου ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν σε ξηρό περιβάλλον.
- Η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα αποτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων καθώς αφαιρείται νερό μέσω της όσμωσης και έτσι τα βακτήρια δεν μπορούν να αναπαραχθούν και να επιβιώσουν (Albaridi, 2019).
- Το μέλι έχει χαμηλό pH (3.9-4.5). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί προτιμούν έναν ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον για να αναπτυχθούν, επομένως δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο pH του μελιού (Iorizzo et al. 2022).

1.13.3 Η αποπτωτική δράση του μελιού

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή αποπτωτική δραστηριότητα και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το μέλι προκαλεί απόπτωση σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων μέσω αποπόλωσης της μιτοχονδριακή μεμβράνης. Παράλληλα, το μέλι προκαλεί την έκφραση της p53, της κασπάσης 3 και της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax ενώ αναστέλλει την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2 (Fauzi et al. 2011). Οι αποπτωτικές ιδιότητες του μελιού το καθιστούν μια πιθανή φυσική ουσία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικός παράγοντας.

1.13.4 Η αντιφλεγμονώδης δράση του μελιού

Η χρόνια φλεγμονή μπορεί να εμποδίσει την επούλωση πληγών καταστρέφοντας τους ιστούς. Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες στο μέλι είναι υπεύθυνη για την αντιφλεγμονώδη δράση. Οι πολυφαινόλες (με κυριότερα τα φλαβοβοειδή) προκαλούν την καταστολή της προ φλεγμονώδους δραστηριότητας της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και/ή την επαγωγίμη συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (iNOS)

(Viuda-Martos et al. 2008). Παράλληλα, το μέλι αυξάνει την παραγωγή T και B λεμφοκυττάρων, αντισωμάτων, ηωσινόφιλων, ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων κατά την πρωτογενή και δευτερογενή ανοσία σε καλλιέργειες ιστών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα σάκχαρα του μελιού έχουν ανοσοενισχυτικές επιδράσεις ενώ άλλα συστατικά του μελιού είναι επίσης υπεύθυνα για την ανοσορύθμιση (Erejuwa et al. 2017).

1.13.5 Σακχαρώδης διαβήτης

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που δείχνουν τις ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Σε κλινικές δοκιμές για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2, η εφαρμογή μελιού σχετίστηκε με χαμηλότερο γλυκαιμικό δείκτη σε σχέση με τη σακχαρόζη ή γλυκόζη στον διαβήτη τύπου 1 ενώ στον διαβήτη τύπου 2 το μέλι έδρασε παρόμοια με τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη (Yarucu Günes et al. 2007). Επιπλέον, τα θεραπευτικά αποτελέσματα του μελιού στη διαχείριση του διαβήτη μπορεί να μην περιορίζονται μόνο στον έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα, αλλά μπορεί να επεκταθούν και στην βελτίωση των σχετικών μεταβολικών νοσημάτων (Eddy et al. 2008).

1.13.6 Καρκίνος

Έρευνες έχουν δείξει ότι το μέλι έχει αντικαρκινική ιδιότητα μέσω της παρεμβολής του σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Το μέλι επάγει την απόπτωση, τροποποιώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ως το μελάνωμα, το αδενοκαρκίνωμα, το οστεοσάρκωμα, την λευχαιμία τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του ήπατος, του παχέος εντέρου, του προστάτη, των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, και του πνεύμονα (Nainu et al. 2021).

1.13.7 Άσθμα

Το μέλι από μόνο του δεν έχει ισχυρές αποδείξεις υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά του στον έλεγχο του άσθματος, αλλά όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, έδειξε σχετικά υψηλή αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με άσθμα. Μελέτες σε ζώα έδειξαν θετικά αποτελέσματα, τα οποία μπορεί να οφείλονται στη

χρήση διαφορετικών μοντέλων (ποντίκια και κουνέλια) ή διαφορετικές μορφές μελιού. Η χρόνια βρογχίτιδα και το βρογχικό άσθμα αντιμετωπίστηκαν με την κατανάλωση μελιού σε ζώα μοντέλα. Οι πνευμονικές λειτουργίες βελτιώνονται λόγω των αντιφλεγμονωδών/αντιαλλεργικών και ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων του μελιού. (Kamaruzaman et al. 2014).

1.13.8 Καρδιαγγειακές παθήσεις

Τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο μέλι μπορεί να σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα φλαβονοειδή μειώνουν τον κίνδυνο στεφανιαίων διαταραχών μέσω τριών μηχανισμών: (α) βελτίωση της αγγειοδιαστολή της στεφανιαίας αρτηρίας, (β) μείωση της ικανότητας πήξης του αίματος, (γ) την αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Επομένως, η φαρμακευτική αγωγή σε συνδυασμό με τις πολυφαινόλες του μελιού έχουν μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την μείωση των καρδιαγγειακών διαταραχών (Khalil et al. 2010).

1.13.9 Η νευρολογική επίδραση του μελιού

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους έδειξαν ότι η χορήγηση μελιού είχαν κάποια πιθανά ευεργετικά αποτελέσματα. Οι πολυφαινόλες του μελιού εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που οδηγούν σε νευροτοξικότητα, γήρανση και παθολογική εναπόθεση λανθασμένων πρωτεϊνών (Schmitt-Schillig et al. 2005). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες αντιμετωπίζουν τις άμεσες αποπτωτικές προκλήσεις και την νευροφλεγμονή της μικρογλοίας η οποία προκαλείται μέσω ανοσογόνων νευροτοξινών ή βλάβης από ισχαιμία (Frank-Cannon et al. 2009). Εξίσου σημαντικό είναι ότι οι πολυφαινόλες του μελιού καταπολεμούν τη νευροφλεγμονή του υπόκαμπου, μια δομή του εγκεφάλου που εμπλέκεται στη μνήμη και έτσι προλαμβάνονται οι διαταραχές της μνήμης (Rahman et al. 2014).

1.13.10 Γαστρεντερικές παθήσεις

Το μέλι έχει προταθεί ως δυνητικά χρήσιμο για διάφορες καταστάσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, ως μέρος της θεραπείας επανυδάτωσης από το στόμα. Μελέτες *in vitro* προτείνουν ότι το μέλι ασκεί βακτηριοκτόνο δράση κατά του ελικοβακτηριδίου

pylori αν και μια κλινική δοκιμή θεραπείας δεν είχε ευεργετικά αποτελέσματα (Oyefuga et al. 2012).

1.14 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΥΨΕΛΗΣ

1.14.1 Γύρη

Οι μέλισσες προσθέτουν μικρές ποσότητες εκκρίσεις σιέλου, νέκταρ ή/και μέλι άλλες κόκκους γύρης. Η γύρη των μελισσών αναφέρεται ως η «μόνη τέλεια πλήρης τροφή», καθώς περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που χρειάζονται ανθρώπινος οργανισμός (Pascoal et al. 2014). Η γύρη των μελισσών περιέχει πρωτεΐνες (5–60%), σάκχαρα (13–55%), λιπίδια (4–7%), ακατέργαστες ίνες (0,3–20%), απαραίτητα αμινοξέα, μέταλλα, και βιοδραστικές ουσίες συμπεριλαμβανομένων βιταμινών, ενζύμων και φαινολικών ενώσεων, κυρίως φλαβονοειδή (3–8% ξηρό βάρος). Η αντιοξειδωτική ικανό άλλες της γύρης προέρχεται κυρίως από τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Αυτές οι ενώσεις επηρεάζουν την οπτική εμφάνιση (μελάγχρωση) και γεύση (στυφότητα και πικρία) του κόκκου (Zuluaga et al. 2015). Ωστόσο, η σύνθεση και η αντιοξειδωτική δράση της γύρης των μελισσών είναι συγκεκριμένη για το είδος, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φυτική πηγή μαζί με τη βιογεωγραφική (περιφερειακή) προέλευση, την οικολογικό ενδιαίτημα και την εποχή.

1.14.2 Πρόπολη

Σε αντίθεση με το μέλι και τη γύρη, η πρόπολη δεν είναι τροφή. Για την παραγωγή της, οι μέλισσες συλλέγουν ρητινώδη υλικά από διάφορα μέρη των φυτών και τα αναμιγνύουν με κερί. Είναι το μελισσοκομικό προϊόν με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε εξειδικευμένους φυτικούς μεταβολίτες (τουλάχιστον το 50% του βάρους του) και χρησιμοποιείται ως αμυντική ουσία της κυψέλης (Borycka et al. 2015). Η πρόπολη στη φύση αποτελείται από 50% ρητίνη και φυτικό βάλσαμο (συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων), 30-40% κερί και λιπαρά οξέα, 5-10% αιθέρια και αρωματικά έλαια, 5% γύρη περίπου 5% άλλες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, μικροθρεπτικών συστατικών και βιταμινών (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη, βιταμίνες C και E) (Al-Waili et al. 2012).

1.14.3 Κερί

Το κερί μέλισσας αποτελείται από σάκχαρα μελιού και έχει μια κρυσταλλική δομή κατάλληλη για την κατασκευή της κυψέλης. Η χημική σύνθεση ποικίλλει ανάλογα με το είδος της μέλισσας και την γεωγραφική θέση και περιλαμβάνει υδρογονάνθρακες, ελεύθερα λιπαρά οξέα και ελεύθερα λιπαρές αλκοόλες, αλλά και εστέρες (Yusop et al. 2019) Το κερί μέλισσας χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε διάφορα βιομηχανικά προϊόντα και διαδικασίες, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, κεριών αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία (Cornara et al. 2017).

1.14.4 Βασιλικός πολτός

Ο βασιλικός πολτός είναι μια ουσία που εκκρίνεται από τους φαρυγγικούς αδένες των μελισσών και είναι μια κιτρινωπή, κρεμώδης, όξινη ουσία με ελαφρά πικάντικη οσμή και γεύση που αποτελείται από νερό (60–70%), πρωτεΐνες (9–18%), σάκχαρα (7–18%) -κυρίως φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη- λιπίδια (3–8%), μέταλλα (0,8–3,0%), τέφρα (0,8–3%) και ίχνη πολυφαινολών και βιταμινών (Pavel et al. 2014). Οι προνύμφες μέλισσες τρέφονται με τον βασιλικό πολτό στα πρώτα στάδια της ζωής ενώ η βασίλισσα τρέφεται με βασιλικό πολτό μέχρι να πεθάνει. Ο βασιλικός πολτός έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλές ιδιότητες όπως απολυμαντική, αντιβακτηριδιακή, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική δράση του βασιλικού πολτού αποδίδεται στις πολυφαινολικές και флаβονοειδή ενώσεις με κύριες ενώσεις τις εξής: κερσετίνη, καμφερόλη, φισετίνη, πινοσεμβρίνη, ναριγγίνη, εσπεριδίνη, απιγενίνη, ακακετίνη, χρυσίνη και λουτεολίνη (Ramanathan et al. 2018).

1.14.5 Δηλητήριο μέλισσας

Το δηλητήριο της μέλισσας είναι ένα μείγμα πολλών συστατικών με αποδεδειγμένη θεραπευτική δράση. Τα κύρια συστατικά είναι πεπτίδια, όπως η μελιτίνη (η οποία είναι και η κύρια συστατικό του δηλητηρίου της μέλισσας) και η απαμίνη, ένζυμα, φωσφολιπίδια, αμίνες (όπως ισταμίνη και κατεχολαμίνες), αμινοξέα, σάκχαρα, πτητικές ουσίες (φερομόνες) και μέταλλα. Το δηλητήριο της μέλισσας εφαρμόζεται σε διάφορες συνθήκες με διάφορα παθοφυσιολογικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του νευρικού, του ανοσοποιητικού ή του καρδιαγγειακού συστήματος (Pavel et al. 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης τριών (3) δειγμάτων μελιού στην κυτταρική βιωσιμότητα και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και Protein Carbonyls της κυτταρικής σειράς γαστρικού ανθρώπινου καρκίνου, MKN45. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκε Γαλάζιο Αγκάθι που είναι μονοανθικό, και τα μέλι Δάσους και Ανθόμελο που χαρακτηρίζονται ως πολυανθικά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τα δείγματα μελιού «γαλάζιο αγκάθι», δάσους και ανθόμελου.

Τύπος Μελιού	Ημερομηνία Συλλογής	Τοποθεσία Κυψέλης
Γαλάζιο Αγκάθι (<i>Eryngium creticum</i>)	06.2020	Μπελόη-Χαράδρα Βίκου
Δάσους	07.2020	Ελάτη Ζαγορίου
Ανθόμελο	07.2020	Βίτσα Ζαγορίου

Πίνακας 1: Δείγματα μελέτης

3.1.1 Γαλάζιο αγκάθι

Το *Eryngium creticum* είναι ένα φυτό που αναπτύσσεται σε χαμηλά υψόμετρα, σε παρυφές δρόμων, σε χώρους απορριμμάτων ακόμη και σε ελαιώνες σε διάφορες χώρες τις Μεσογείου και εμφανίζει μεγάλη αντοχή στο περιβαλλοντικό στρες (Jawdat et al., 2010). Το *E. creticum* είναι ένα αγκαθωτό σφαιροειδές βότανο, που φτάνει τα 50 cm σε ύψος και έχει όρθιους διακλαδισμένους μίσχους. Τα φύλλα του στελέχους είναι άμισχα και χωρίζονται σε 3-8 αγκαθωτούς λοβούς. Τα άνθη είναι γαλάζια, αγκαθωτά και φτάνουν σε μήκος έως 5 cm (Kikowska et al. 2016).



Εικόνα 17: *Eryngium Creticum*

3.1.2 Μέλι δάσους

Το μέλι δάσους συλλέγεται από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο από μια μεγάλη ποικιλία δέντρων όπως βελανιδιές, πεύκα, έλατα, καστανιές και άγρια βότανα αλλά και άλλα αυτόχθονα είδη φυτών. Το μέλι δάσους, όπως όλα τα σκουρόχρωμα μέλια, διαθέτει υψηλή θρεπτική αξία, αντιοξειδωτική δράση αλλά και αντισηπτικές ιδιότητες (Alvarez-Suarez et al. 2014).

3.1.3 Ανθόμελο

Το μέλι ανθέων προέρχεται από το νέκταρ των φυτών και αγριολούλουδων των βουνών, συλλέγεται κατά την περίοδο από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο και διαθέτει ένα φωτεινό κεχριμπαρένιο χρώμα. Η απόχρωση, η γεύση και το άρωμά του διαφέρουν ανάλογα με τα άνθη και την τοποθεσία της κυψέλης ενώ μπορεί να διαφέρει και από χρονιά σε χρονιά (Egejuwa et al. 2009).

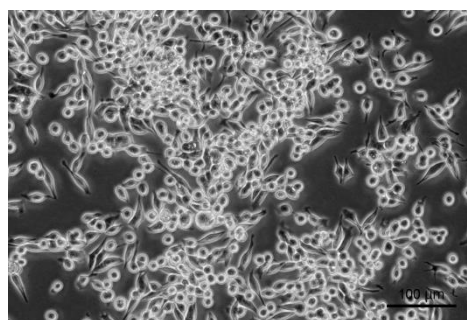
3.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των τριών δειγμάτων μελιού προηγήθηκε η προετοιμασία διαλυμάτων. Πριν από κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε ζύγιση και διαλυτοποίηση του εκάστοτε δείγματος σε απιονισμένο νερό (dH₂O) σε θερμοκρασία 35-40 °C για 5', έτσι ώστε να γίνει ομογενοποίηση και πλήρης διαλυτοποίηση του δείγματος σε συγκέντρωση stock 500 mg/ml. Η θερμοκρασία δεν πρέπει αυστηρώς να υπερβαίνει τους 50 °C γιατί τότε παράγονται ανεπιθύμητες ενώσεις όπως η HMF (5' υδροξυμεθυλοφορφοϋράλη). Τέλος, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με θρεπτικό μέσο RPMI 1640 εμπλουτισμένο με ορό FBS σε συγκεντρώσεις: 1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, και 25 mg/ml.

3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.3.1 Κυτταρική σειρά

Για την παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN45). Πρόκειται για κύτταρα από ανθρώπινο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα μιας 62χρονης γυναίκας. Μορφολογικά, τα κύτταρα εμφανίζουν στρογγυλό, ωοειδές σχήμα ή σχήμα ατράκτου. Ορισμένες φορές έχουν παρατηρηθεί και κόκκοι βλέννας, συσσωματώματα γλυκογόνου αλλά και μικρολάχνες στην ελεύθερη τους επιφάνεια (Motoyama et al. 1986, American Type Culture Collection, ATCC).



Εικόνα 18: Κύτταρα MKN45

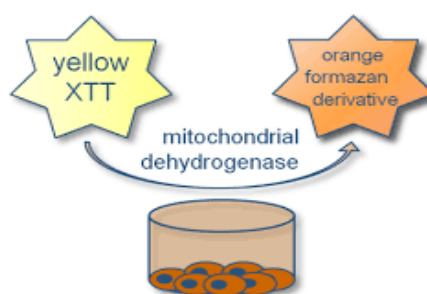
3.3.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες εμβαδού 75 cm² (T75) με θρεπτικό μέσο RPMI 1640 που εμπεριέχει ορό βοδινού (FBS, 10% v/v), 2 mM L-γλουταμίνη και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης (1%), και διατηρήθηκαν σε κλίβανο με συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C και συγκέντρωση CO₂ 5%.

Το RPMI 1640 Medium περιέχει βιοτίνη, βιταμίνη B12 και PABA, ινοσιτόλη και χολίνη υπάρχουν σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Το RPMI 1640 Medium δεν περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια ή αυξητικούς παράγοντες. Επομένως, το RPMI 1640 Medium απαιτεί συμπλήρωμα, συνήθως με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS). Το RPMI 1640 Medium χρησιμοποιεί ένα ρυθμιστικό σύστημα διττανθρακικού νατρίου (2,0 g/L) και επομένως απαιτεί περιβάλλον 5–10% CO₂ για τη διατήρηση του φυσιολογικού pH (Weinreich et al. 2012).

3.3.3 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των μελιών με τη μέθοδο XTT

Η κυτταροτοξικότητα των συγκεντρώσεων των 3 δειγμάτων ελέγχθηκε μέσω της δοκιμασίας βιωσιμότητας κυττάρων XTT. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στον μετατροπή του κίτρινου τετραμμονιακού άλατος (XTT) στην αντίστοιχη πορτοκαλί φορμαζάνη από τις αφυδρογονάσες του μιτοχονδρίου των ζωντανών κυττάρων. Η υδατοδιαλυτή φορμαζάνη απορροφάται στα 450 nm και όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση τόσο περισσότερα κύτταρα έχουν επιβιώσει.



Εικόνα 19: Μετατροπή XTT στην φορμαζάνη

Αρχικά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν έπειτα από χορήγηση θρυψίνης και μετρήθηκαν με την αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer για να υπολογιστεί η ποσότητα που πρέπει να επιστρωθεί σε κάθε πηγαδάκι από την πλάκα 96 θέσεων ώστε να προκύπτουν 10.000 κύτταρα/θέση. Μετά από επώαση 24 ωρών στους 37 °C, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού στο θρεπτικό μέσο (χωρίς ορό) για 24 ώρες. Έπειτα, παρασκευάστηκε το XTT mastermix με ανάμειξη 49 μL αντιδραστηρίου σήμανσης XTT με 1 μL αντιδραστηρίου σύζευξης ηλεκτρονίων, προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι (50 μl ανά πηγαδάκι) και έγινε επώαση για 4 ώρες. Μετά την επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm και στα 630 nm ως

μήκος κύματος αναφοράς. Οι τιμές απορρόφησης στα 630 nm αφαιρέθηκαν από τις τιμές στα 450 nm.

$$\% \text{ βιωσιμότητα κυττάρων} = \frac{(Abs \text{ μάρτυρα} - Abs \text{ δείγματος})}{Abs \text{ μάρτυρα}} \times 100$$

3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Για την προετοιμασία των κυττάρων για την πειραματική διαδικασία αρχικά έγινε μέτρηση σε πλάκα Neubauer (βλ. 3.3) ώστε σε κάθε φλάσκα T₇₅ να υπάρχουν 3.000.000 κύτταρα και ακολούθησε 24ωρη επώαση. Έπειτα, έγινε πλύση των κυττάρων με PBS και πραγματοποιήθηκε χορήγηση των δειγμάτων στις επιλεγμένες συγκεντρώσεις για κάθε δείγμα. Μετά από επώαση 24 ωρών, έγινε πλύση με PBS και προσθήκη PBS με αναστολείς πρωτεασών ώστε να αποτραπεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών των κυττάρων και ακολούθησε αποκόλληση τους με ξέστρο. Έπειτα, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια erpendorf των 1.5 ml και ακολούθησε η διαδικασία των υπερήχων με παλμό υπερήχων 0.7 δευτερόλεπτα και πλάτος κύματος 70%, για 10 δευτερόλεπτα, με ενδιάμεσο διάστημα παύσης 10 δευτερολέπτων για συνολικό χρόνο 100 δευτερολέπτων. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση στους 4 °C για 20 λεπτά στα 15000g και στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο erpendorf και διατηρήθηκε στους -80 °C μέχρι την ημέρα του πειράματος.

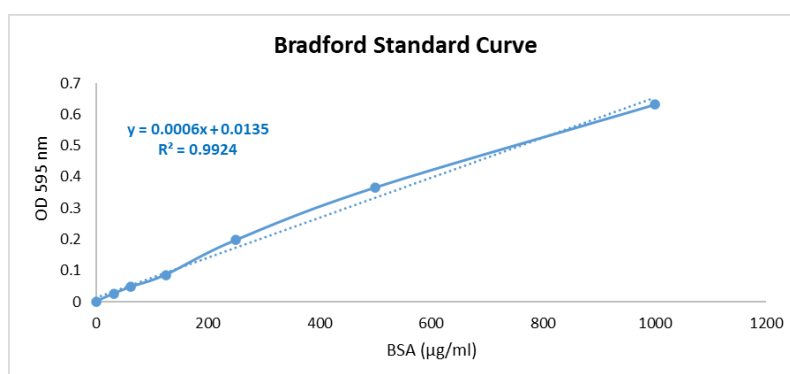
3.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων είναι απαραίτητος ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης του κυτταρολύματος μέσω της μεθόδου Bradford. Στα αντιδραστήριο Bradford (100mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, 50ml 95% αιθανόλη, 100ml 85% (w/v) φωσφορικό οξύ, dH₂O μέχρι το 1L) περιέχει την χρωστική, η οποία αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης αποκτά ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φωτομετρικά στα 595nm.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωληνάκια erpendorf, έγινε προσθήκη 20μl δείγματος αραιωμένου κυτταρολύματος (1/5) και 1ml αντιδραστηρίου Bradford, ενώ για το τυφλό έγινε προσθήκη 20μl PBS και 1ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Μετά από επώαση 15 λεπτών στο σκοτάδι, μετρήθηκε η απορρόφηση σε πλαστική κυψελίδα στα 595 nm.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης έγινε μέσω της εξίσωσης πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης αναφοράς σε mg/ml (Patsoukis et al. 2004).



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

3.4.2 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) περιγράφει την ικανότητα των συστατικών του κυτταρολύματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι υπολογισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού και επακόλουθο άθροισμα τους ενώ ο δεύτερος είναι η μέτρηση της συνολικής TAC.

Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται με την χρήση του αντιδραστηρίου DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων η ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς την αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) και η μετατροπή αυτή υπολογίζεται στα 520 nm.

Πειραματική διαδικασία

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρειάζονται 40 mg πρωτεΐνης, επομένως, οι ποσότητες του κυτταρικού αιωρήματος προκύπτουν από την μέθοδο Bradford. Αρχικά, προστέθηκαν σε σωληνάκια erpendorf 500 μl phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) και 500 μl από το αραιό διάλυμα DPPH (0.1 mM), χωρίς την προσθήκη εναιωρήματος, για

το τυφλό. Ενώ στα σωληνάρια των δειγμάτων, προστέθηκαν 500-X (όπου X η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος, όπως προέκυψε από την μέθοδο Bradford) μl phosphate buffer, 500 μl αραιού διαλύματος DPPH. Τα σωληνάρια αναδευτήκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 1 ώρα έτσι ώστε τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταρολύματος να εξουδετερώσουν την ρίζα DPPH. Μετά την επώαση έγινε 3 λεπτή φυγοκέντρωση, στους 25°C και στα 15000g και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε πλαστική για να μετρηθεί η απορρόφηση του στα 520 nm. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν από την αναγωγή της DPPH- σε DPPH:H (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζίνη) που προκαλείται από τα αντιοξειδωτικά του κυτταρολύματος (Janaszewska et al. 2002).

3.4.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενεργών και ασταθών λιπιδικών υπεροξειδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα του κυττάρου. Η διάσπαση αυτών των λιπαρών οξέων προκαλεί την παραγωγή μαλονδιαλδεΐδης που προσδιορίζεται μέσω της αντίδρασής με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης αποτελεί μέτρο για τον προσδιορισμό την λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης και η απορρόφηση τους μετράται στα 530 nm.

Πειραματική διαδικασία

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρειάζονται τουλάχιστον 80 mg πρωτεΐνης, επομένως, οι ποσότητες του κυτταρικού αιωρήματος προκύπτουν από την μέθοδο Bradford. Αρχικά, προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) X μl του κυτταρικού εναιωρήματος, 400- X (όπου X η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος, όπως προέκυψε από την μέθοδο Bradford) μl PBS, 500 μl Tris-HCl (200 mM, pH 7.4) και 500 μl 35% TCA, ενώ για το τυφλό προστέθηκαν 400 μl PBS αντί για X μl του κυτταρικού εναιωρήματος και (400- X) μl PBS και ακολούθησε ανάδευση. Μετά από επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε 1 ml Na₂SO₄ – TBA και ακολούθησε επώαση 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Στην συνέχεια, τα Falcon μεταφέρθηκαν στον πάγο για να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις κρυσώσουν τα δείγματα, προστέθηκε 1 ml TCA 70% και έπειτα από ανάδευση μεταφέρθηκε 1 ml σε σωληνάρια eppendorfs. Μετά από 3λεπτή φυγοκέντρωση στα 11200g στους 25

°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινη κυψελίδα και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 530 nm.

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε μέσω του τύπου ($\mu\text{mol/l}$) = $[(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156] * (3400 / X)$, όπου X = η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος, και το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης (ισούται με την απορρόφηση της ουσίας σε συγκέντρωση 1 mol/l) της MDA που είναι 156000 (mol/l) διαιρούμενο με 10^{-6} έτσι ώστε τα mol/l να μετατραπούν σε $\mu\text{mol/l}$ (Keles et al. 2001; Skaperda et al. 2021).

3.4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν έναν δείκτη για την εκτίμηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών. Οι καρβονυλικές ομάδες παράγονται στα κατάλοιπα προλίνης (pro), αργινίνης (arg), λυσίνης (lys) και θρεονίνης (thr). Είναι αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης καθώς οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται αποκτούν μη αναστρέψιμες βλάβες. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων εντοπίζονται από την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) που οδηγεί στον σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

Πειραματική διαδικασία

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρειάζονται τουλάχιστον 80 mg πρωτεΐνης, επομένως, οι ποσότητες του κυτταρικού αιωρήματος προκύπτουν από την μέθοδο Bradford. Αρχικά, προστέθηκαν σε σωληνάρια erpendorf X μl του κυτταρικού εναιωρήματος και $400 - X$ (όπου X η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος, όπως προέκυψε από την μέθοδο Bradford) μl PBS και έγινε ανάδευση με vortex. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 0.5 ml του 14 mM DNPH (14 mM) στα δείγματα και 0.5 ml 2.5 N HCL (2.5 N) στα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση ανά 15 λεπτά. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση στους 4°C στα 15000 g για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου έγινε πλύση με 1 ml TCA 10% και σπάσιμο του ιζήματος με την πιπέτα και ξανά φυγοκέντρηση στους 4°C στα 15000 g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1 ml μείγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (με αναλογία 1:1 v/v) και ακολούθησε ανάδευση και φυγοκέντρηση. Το παραπάνω βήμα πραγματοποιήθηκε άλλες 2 φορές. Οι πλύσεις με TCA 10% και με μείγμα

αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα γίνονται για να απομακρυνθεί το DNPΗ που δεν αντέδρασε. Μετά τις πλύσεις απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml ουρία (5 M, pH 2.3) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά για να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και να αυξηθεί η διαλυτότητά τους. Μετά από φυγοκέντρηση στους 4°C στα 15000 g για 3 λεπτά, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία (Quartz) και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 375 nm.

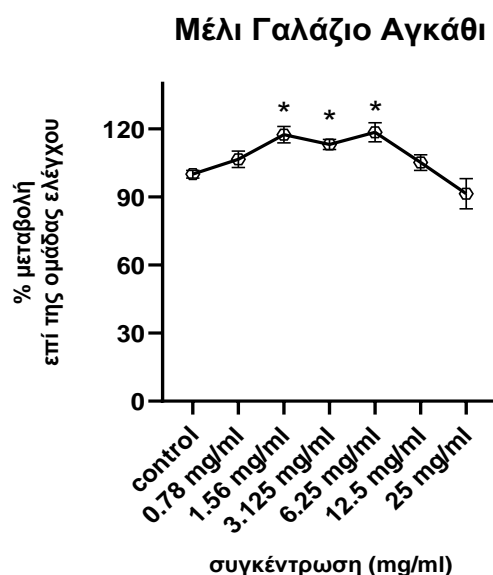
Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίστηκε μέσω του τύπου $(\text{nmol/l}) = [(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.022] * (1000 / X)$, όπου $X = \eta$ ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος, και το 0.022 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής αποσβεσης και υπολογίστηκε ως εξής: 22 mmol / l ισούται με 22 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ που ισούται με 0,022 nmol / ml. Όπου 1000 / X είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000 μl στην κυψελίδα / X μl του δείγματος)/ τέλος η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης υπολογίζεται ως εξής: Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol / mg) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol / ml / συγκέντρωση πρωτεΐνης mg / ml (Patsoukis et al. 2004).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΚΝ45

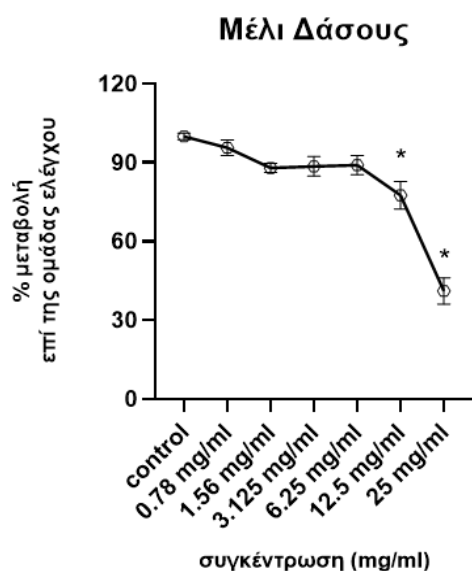
Για τον προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των τριών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ.

Για το πρώτο δείγμα, δηλαδή το μέλι από το *Γαλάζιο Αγκάθι* στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml και 6.25 mg/ml εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ενώ οι συγκεντρώσεις 12.5 mg/ml και 25 mg/ml δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή.



Διάγραμμα 2: Η επίδραση καθεμίας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού «Γαλάζιο Αγκάθι» (*Eryngium creticum*).

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

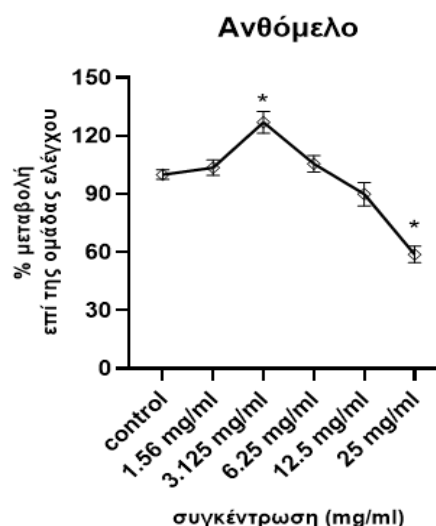


Διάγραμμα 3: Η επίδραση καθεμίας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του μελιού δάσους.

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

Για το δεύτερο δείγμα, δηλαδή το μέλι δάσους, στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml και 6.25 mg/ml δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή ενώ στις συγκεντρώσεις 12.5 mg/ml και 25 mg/ml εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Για το τρίτο δείγμα, δηλαδή το ανθόμελο, στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml, 6.25 mg/ml και 12.5 mg/ml δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Ωστόσο, στην συγκέντρωση 3.125 mg/ml παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας ενώ στην συγκέντρωση 25 mg/ml εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας.



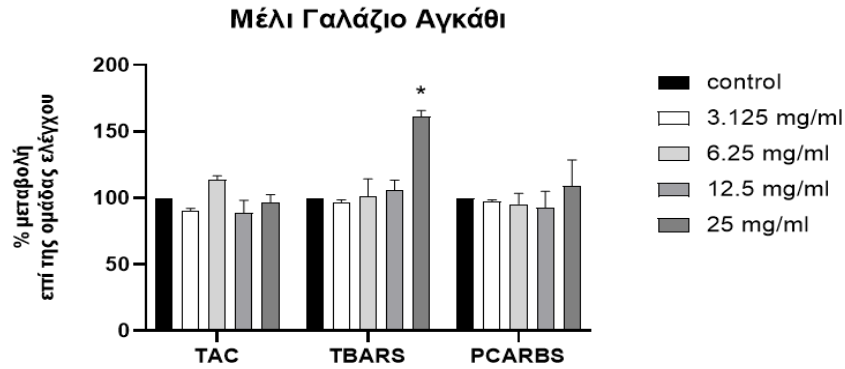
Διάγραμμα 4: Η επίδραση καθεμίας από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του ανθόμελου.

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

4.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΜΚΝ45 ΚΥΤΤΑΡΑ

Μετά από τον προσδιορισμό των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων ακολούθησε επώαση 24 ωρών και πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιδράσεων τους στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Συγκεκριμένα, έγινε αξιολόγηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), των βιοδεικτών TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων, που φανερώνουν την οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων και πρωτεϊνών αντίστοιχα.

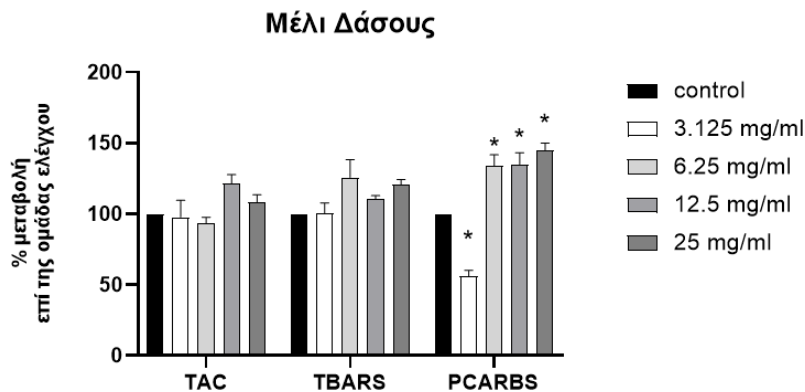
Όσον αφορά το μέλι «γαλάζιο αγκάθι», εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml , 6,25 mg/ml , 12.5 mg/ml και 25 mg/ml. Η συγκέντρωση 50 mg/ml, απορρίφθηκε λόγω υψηλής κυτταροτοξικής δράσης στα ΜΚΝ45. Στα επίπεδα της TAC και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε καμία συγκέντρωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ενώ τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στα 25 mg/ml.



Διάγραμμα 5: Η επίδραση καθεμίας από τις συγκεντρώσεις του μελιού «Γαλάζιο αγκάθι» στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και PCARBS.

* $p < 0.05$, στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου

Όσον αφορά το μέλι δάσους, εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml – 25 mg/ml και η συγκέντρωση 50 mg/ml, απορρίφθηκε λόγω υψηλής κυτταροτοξικής δράσης στα MKN45. Στα επίπεδα της TAC και των TBARS, δεν εμφανίστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή σε καμία συγκέντρωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στα 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml και 25 mg/ml, ενώ στην συγκέντρωση 3.125 mg/ml εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση.

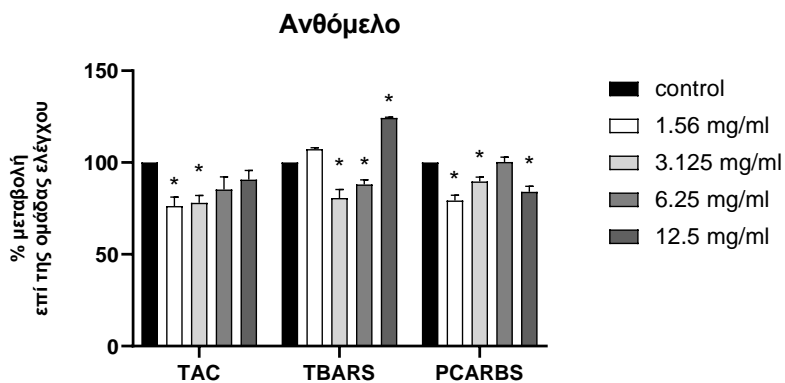


Διάγραμμα 6: Η επίδραση καθεμίας από τις συγκεντρώσεις του μελιού δάσους σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και PCARBS.

* $p < 0.05$, στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου

Όσον αφορά το ανθόμελο, εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml – 12.5 mg/ml. Οι συγκεντρώσεις 25 mg/ml και 50 mg/ml, απορρίφθηκαν λόγω υψηλής κυτταροτοξικής δράσης στα MKN45. Στα επίπεδα της TAC, εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml και 3.125 mg/ml. Στα επίπεδα των

TBARS, εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml και 6.25 mg/ml, ενώ στην συγκέντρωση 12.5 mg/ml παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση. Τέλος, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml και 12.5 mg/ml.



Διάγραμμα 7: Η επίδραση καθεμίας από τις συγκεντρώσεις του ανθόμελου σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και PCARBS.

* $p < 0.05$, στατιστικώς σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων μελιού *Eryngium creticum*, δάσους και ανθόμελου μέσω αξιολόγησης βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN45).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού που παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπεροξειδισώματα, τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα λυσοσώματα (Balaban et al., 2005) διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν οξειδωτικό στρες καταλήγοντας συχνά στη διαταραχή της σηματοδότηση και την απορρύθμιση της οξειδοαναγωγής κατάστασης (Sies et al., 2017). Κατά το οξειδωτικό στρες, προκαλούνται βλάβες στα βιομόρια και αυτό μπορεί τελικά να οδηγήσει σε κυτταρική βλάβη, μεταλλάξεις ή και στην προαγωγή της καρκινογένεσης και την ευαισθητοποίηση του οργανισμού σε ασθένειες (Jamshidi-kia et al. 2020). Ωστόσο, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η διατροφή, το κάπνισμα, ορισμένα φάρμακα, η έκθεση σε ακτινοβολίες κ.ά. (Phaniendra et al, 2015).

Οι οργανισμοί προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις δυσμενείς επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την αδρανοποίησή τους (Rani et al. 2016). Η οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου εξασφαλίζεται από ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και μη ενζυμικές ενώσεις όπως η γλουταθειόνη (Poljsak et al. 2013). Παράλληλα, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά που υπάρχουν σε τρόφιμα όπως φρούτα, λαχανικά και το μέλι μπορούν να ενισχύσουν την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα. Αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες θεωρούνται τα κύρια εξωγενή αντιοξειδωτικά (Willett et al. 2007). Μια άλλη πηγή εξωγενών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα συμπληρώματα διατροφής, ως πηγές θρεπτικών συστατικών όπως οι βιταμίνες, μέταλλα, λιπαρά οξέα ή αμινοξέα, τα οποία είτε λείπουν ή δεν βρίσκονται στις απαραίτητες ποσότητες στη διατροφή (Poljsak et al. 2012).

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν, γνωστό για τις αντιοξειδωτικές και αντιμικρο-

βιακές ιδιότητες του. Αποτελείται κυρίως από σάκχαρα όπως μονοσακχαρίτες, δι-σακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Περιέχει ένζυμα όπως οξειδάση γλυκόζης, ινβερτάση, καταλάση και υπεροξειδάση αλλά και άλλα βιοδραστικά συστατικά όπως οργανικά οξέα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, πολυφαινόλες κ.ά. (Bogdanov et al. 2008). Η σύσταση του περιλαμβάνει βιταμίνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία αλλά και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών που χαρίζουν στο μέλι τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες του κάνοντας το μία υπέρ-τροφή υψηλής αξίας (Cianciosi et al., 2018). Οι πολυφαινόλες στο μέλι ποικίλουν ανάλογα με τα είδη των φυτών από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν το νέκταρ και τη γύρη. Ως αντιοξειδωτικά, συμβάλλουν στην προστασία του οργανισμού από την οξειδωτική βλάβη και την πρόληψη διάφορων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές νόσοι και ο καρκίνος (Wang et al. 2020). Ακόμη, μπορεί να επηρεάζουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού όπως το χρώμα, τη γεύση και την οσμή. Ωστόσο, η σύσταση του μελιού επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η γεωγραφική και βοτανική προέλευση, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει και την θρεπτική του αξία (Scholz et al. 2020).

Η συγκεκριμένη εργασία έγινε με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης τριών (3) δειγμάτων μελιού στην κυτταρική βιωσιμότητα και στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και Protein Carbonyls της κυτταρικής σειράς γαστρικού ανθρώπινου καρκίνου, MKN45. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μέλι «Γαλάζιο Αγκάθι», μέλι Δάσους και Ανθόμελο. Το πρώτο προέρχεται από μια ποικιλία βοτάνων και αγριολουλούδων, αλλά το κύριο φυτό είναι το «Γαλάζιο αγκάθι» που εκφύεται στις χώρες της Μεσογείου και εμφανίζει μεγάλη αντοχή στο περιβαλλοντικό στρες (Kikowska et al. 2016). Το μέλι Δάσους προέρχεται από το νέκταρ δέντρων όπως βελανιδιές, πεύκα, έλατα, καστανιές και άγρια βότανα ενώ το Ανθόμελο περιέχει νέκταρ φυτών και αγριολούλουδων (Alvarez-Suarez et al. 2014). Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN4) που προέρχονται από γαστρικό αδενοκαρκίνωμα μιας 62χρονης γυναίκας και χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή στις συνθήκες *in vitro* (ATCC).

Για να αξιολογηθεί η επίδραση των δειγμάτων μελιού στην βιωσιμότητα κυττάρων MKN45 ακολουθήθηκε η μέθοδος XTT έπειτα από επώαση 24 ωρών. Για το μέλι «Γαλάζιο Αγκάθι», συγκέντρωση υψηλότερη από τα 25 mg/ml προκάλεσε κυτταροτοξικότητα. Αντίθετα, στο μέλι Δάσους και το Ανθόμελο εμφανίστηκε στατιστικώς

σημαντική μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα και στα 25 mg/ml. Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι το μέλι «Γαλάζιο Αγκάθι» είναι λιγότερο τοξικό για τα κύτταρα MKN45. Σε άλλη μελέτη που έγινε σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου (AGS), πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την μέθοδο CellTiter-Glo. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από 24 ώρες επώασης, το μέλι μελιτώματος *Quercus pyrenaica* εμφάνισε στατιστικώς σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά τα 17 mg/ml ενώ πολυανθικό μέλι *Canakkale* εμφάνισε κυτταροτοξικότητα μετά τα 45 mg/ml (Kocyigit et al. 2019). Ακόμη, σε μελέτη που αφορούσε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα νεφρού (ACHN) έγινε δοκιμασία MTT και πραγματοποιήθηκε επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις πολυανθικών μελιών για 24, 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά υψηλές ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση και τον χρόνο. Η έκθεση των κυττάρων ACHN για 24 ώρες μείωσε τον αριθμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις 5%, 10%, 20% mg/ml. Από την άλλη πλευρά, η έκθεση των κυττάρων για 48 και 72 ώρες είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων και στην συγκέντρωση 2.5% mg/ml (Samarghandian et al. 2011).

Έπειτα από τον προσδιορισμό των τοξικών συγκεντρώσεων των τριών δειγμάτων, ακολούθησε η αξιολόγηση κάθε συγκέντρωσης, βάσει των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, μετά από την επώαση 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της TAC και εκτίμηση της επίδρασης των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS, με τη χρήση φασματοφωτομετρίας. Η μέτρηση των TBARS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων, ενώ τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων χαρακτηρίζουν τον βαθμό καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών.

Όσον το μέλι «Γαλάζιο Αγκάθι», δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της TAC και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αλλά σημειώθηκε αύξηση των TBARS στην συγκέντρωση 25 mg/ml. Αυτή η παρατηρούμενη αύξηση δείχνει ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων δεν επαρκούν έναντι των TBARS, επομένως τα κύτταρα είναι επιρρεπή στην οξειδωτική βλάβη. Μία άλλη μελέτη αξιολόγησε την επίδραση του μελιού φράουλας στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HCT-116 και LoVo. Τα κύτταρα HCT-116 επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις μελιού 3, 6, 9 και 12 mg/ml ενώ τα LoVo επώαστηκαν σε συγκεντρώσεις μελιού 10, 20, 30 και 40 mg/ml. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα

HCT-116 σε συγκεντρώσεις 6 mg/ml και 12 mg/ml παρουσιάστηκε αύξηση των επιπέδων TBARS ενώ στα LoVo παρουσιάστηκε αύξηση στην συγκέντρωση 40 mg/ml. (Afrin et al. 2019).

Στα αποτελέσματα που αφορούν το μέλι Δάσους, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της TAC και των TBARS. Ωστόσο, στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στην συγκέντρωση 3.125 mg/ml και αύξηση στις επόμενες. Αυτές οι μεταβολές, ενδεχομένως, δείχνουν ότι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά των κυττάρων μπορούν να αποτρέψουν την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μέχρι την συγκέντρωση 3.125 mg/ml του δείγματος του μελιού δάσους. Η παραπάνω μελέτη των Afrin et al. έδειξε ότι στα HCT-116 σε συγκεντρώσεις 6, 9 και 12 mg/ml παρουσιάστηκε αύξηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ενώ στα LoVo παρουσιάστηκε αύξηση σε όλες τις συγκεντρώσεις (10, 20, 30 και 40 mg/ml) (Afrin et al. 2019). Κατά την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, σχηματίζονται οι βαριά καρβονυλιωμένα συσσωματώματα πρωτεϊνών που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν από τα πρωτεασώματα, θέτοντας σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Akagawa, 2021).

Τέλος, το Ανθόμελο ήταν το δείγμα που παρουσίασε τις μεγαλύτερες μεταβολές. Στα επίπεδα της TAC, εμφανίστηκε μείωση στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml και 3.125 mg/ml, ενώ στα επίπεδα των TBARS εμφανίστηκε μείωση στις συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml και 6.25 mg/ml και αύξηση στην συγκέντρωση 12/5 mg/ml. Αυτή η αύξηση ίσως, φανερώνει ότι τα αντιοξειδωτικά των κυττάρων δεν επαρκούν για να αποτρέψουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων για συγκεντρώσεις άνω των 12.5 mg/ml. Μία μελέτη που έγινε για την αξιολόγηση της επίδρασης διάφορων δειγμάτων μελιού σε ερυθροκύτταρα έδειξε, επίσης μείωση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, που πιθανώς την ικανότητά του δείγματος να μειώνει την οξειδωτική βλάβη (Hilary et al. 2017). Παράλληλα, στην παρούσα εργασία, στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, παρουσιάστηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 1.56 mg/ml, 3.125 mg/ml και 12.5 mg/ml και συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα διαθέτουν επαρκείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για να αποτρέψουν την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών για τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός της μείωσης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της μείωσης των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων για τις συγκεντρώσεις 3.125 mg/ml και 1.56 mg/ml αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι τα αντιοξειδωτικά των κυττάρων έδρασαν για να εξουδετερώσουν τις βλάβες των βιομορίων και έτσι μειώθηκε η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των

κυττάρων.

Προηγούμενες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της συγκεκριμένης, δείχνουν ότι τα μέλια που έχουν προκύψει με διαφορετικές συνθήκες έχουν διαφορετικά βιοχημικά προφίλ. Παράγοντες όπως η τοποθεσία, οι κλιματικές συνθήκες, η σύσταση του εδάφους και το είδος των επικονιαστές στο περιβάλλον που περιβάλλει τις κυψέλες επηρεάζουν τη σύνθεση του μελιού (Azevedo et al. 2021). Επιπλέον, ο τρόπος συλλογής και επεξεργασίας του μελιού μπορεί να επηρεάσει την τελική τους σύσταση. Παράγοντες όπως ο χρόνος συλλογής, ο τρόπος εξαγωγής και η μέθοδος επεξεργασίας μπορούν να διαφέρουν ανάμεσα σε διάφορες τοποθεσίες ή/και παραγωγούς (Soares et al. 2017). Με αυτόν τον τρόπο, επισημαίνεται η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην σύσταση του μελιού και, συνεπώς, στην αντιοξειδωτική του δράση.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους βάσει των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC, TBARS και πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι το μέλι «Γαλάζιο Αγκάθι» δεν επέφερε σημαντικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις στα ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα (MKN45). Αντίθετα, το μέλι Δάσους έδρασε θετικά έναντι της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης καθώς μείωσε την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενώ, το Ανθόμελο ήταν το δείγμα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς προστάτευσε τα κύτταρα από την λιπιδική υπεροξείδωση και από την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Συμπερασματικά, βασιζόμενοι στην παρούσα μελέτη μπορούμε να υποθέσουμε ότι το μέλι Δάσους και το Ανθόμελο, ενδεχομένως, μπορούν να προσφέρουν οφέλη για την υγεία, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού, ενώ απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα τόσο *in Vitro* όσο και σε κλινικό επίπεδο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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. Giam-pieri 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 meta-static activity in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 57, 477–487.
2. Akagawa, M. (2021) Protein carbonylation: Molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radic Res* 55: 307–320, 2021.
3. Akanmu MA, Echeverry C, Rivera F. & Dajas F (2009). Antioxidant and Neuroprotective Effects of Nigerian Honey. *Proceedings of the Neuroscience Meeting Planner*, Washington, DC, USA.
4. Al-Waili N., Salom K., Al-Ghamdi A. & Javed Ansari M. (2012) Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal*. Volume 2012 | Article ID 930849.
5. Albaridi, N. (2019) Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology* Volume 2019, Article ID 2464507.
6. Alugoju P., Dinesh Babu J. & Latha P. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* volume 30, pages11–26.
7. Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F. & Battino, M. (2014). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 21(26), 3042–3059.
8. Andreatza, A. C., Kapogiannis, D. & Kaur, C. (2017). Oxidative stress and antioxidant abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder: a selective review. *Schizophrenia research*, 176(2-3), 1-8.
9. Azevedo, M. S., Seraglio, S. K. T., Bergamo, G., Rocha, G. O., Valese, A. C., Dagher, H., Miotto, M., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2021). Physicochemical properties and biological activities of bracatinga honeydew honey from different geographical locations. *J Food Sci Technol*, 58(9), 3417–3429.
10. Bâcvarov, V.I. (1970) Treatment of chronic bronchitis and bronchial asthma with

- honey. *Therapie der Gegenwart*, 01 Feb 1970, 109(2):260-268.
11. Balaban, R., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005) Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, Vol. 120, 483–495.
 12. Bansal, M. & Kaushal, N. (2014) *Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation*, Springer, ISBN 978-81-322-2031-2, DOI 10.1007/978-81-322-2032-9.
 13. Barra, J., Pérennou, D., Thilo, K., Gresty, M. & Bronstein, A. (2012) The awareness of body orientation modulates the perception of visual vertical. *Neuropsychologia*. Volume 50, Issue 10, August 2012, Pages 2492-2498.
 14. Barrett, J., Brennan, J. & Moran, N. (2006) Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods* 2006:64:84-95.
 15. Beretta, G., Orioli, M. & Facino, R.M. (2007) Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med* 2007:73:1182-9.
 16. Becerril-Sánchez, A., Quintero-Salazar, B., Dublán-García, O. & Escalona-Buendía, Héctor (2021) Phenolic Compounds in Honey and Their Relationship with Antioxidant Activity, Botanical Origin, and Color. *Antioxidants*.
 17. Bell, S.G. (2007) The therapeutic use of honey. *Neonatal Netw* 2007:26:247-51.
 18. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3289-3303.
 19. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. (2008) Honey for nutrition and health: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 2008, 27, 677–689.
 20. Bonté, F., & Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.
 21. Borycka, K., Grabek-Lejko, D. & Kasprzyk I. (2015) Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products. *Journal of Apicultural Research*. Volume 54, 2015 - Issue 5.
 22. Chevion, M., Berenshtein, E. & Stadtman E.R. (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, 01 Nov 2000, 33 Suppl: S99-108. PMID: 1119128.
 23. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P.P., Zhang, J., Lamas, L.B., Martínez Flórez, S., Toyos, P.A, Quiles, J.P., Giampieri, F. & Battino M. (2018) Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. Volume 23. Issue 9

- 10.3390/molecules23092322.
24. Cornara, A., Biagi, M., Xiao, J. & Burlando B. (2017) Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front. Pharmacol.*, 28 June 2017. Volume 8 – 2017.
 25. Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing.
 26. Darenskaya, M.A., Kolesnikova, L.I. & Kolesnikov S.I. (2021). Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* volume 171, pages179–189.
 27. DeCoursey, T.E. & Ligeti, E. (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2173–2193. 1420-682X/05/202173-21. DOI 10.1007/s00018-005-5177-1.
 28. De la Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., & Martínez Castro, I. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483-1489.
 29. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 32, Issue 11, 1 June 2002, Pages 1102-1115.
 30. Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E. & Santini A. (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health, *Phytother. Res.*, 33, 2221 —2243.
 31. Dżugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P. & Grabek-Lejko, D. (2018) Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules* 2018, 23(8), 2069.
 32. Eddy, J.J., Gideonsen, M.D. & Mack, G.P. (2008). Practical considerations of using topical honey for neuropathic diabetic foot ulcers: A review. *WMJ* 2008;107:187 90.
 33. Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., & Wahab, M.S.A. (2012). Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: A review of the literature. *Molecules*, 17(4), 2484-2498.
 34. Eruygur, N., Koçyiğit U.M., Taslimi, P., Ataş, M., Tekin, M. & Gülçin, I. (2019) Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany*. Volume 120, January 2019, Pages 141-145.

35. Fauzi, A.N., Norazmi, M.N. & Yaacob, N.S. (2011). Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 49, Issue 4, April 2011, Pages 871-87.
36. Field, C., Johnson, I. & Schley, P. (2002) Nutrients and their role in host resistance to infection. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 71, Issue 1 p. 16-32..
37. Forman, H. J. & Zhang, H. (2009). Signaling pathways for mitochondrial oxidant formation: recent advances. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24879-24885.
38. Forman, H. J. & Zhang, H. (2021) Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* volume 20, pages689–709.
39. Frank-Cannon, T.C., Alto, L.T., McAlpine, F.E. & Tansey, M.G. (2009) “Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?” *Molecular Neurodegeneration*, vol. 4, no. 1, article 47.
40. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583-1606.
41. Gaschler, M. & Stockwell, B. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 482, Issue 3, 15 January 2017, Pages 419-425.
42. Gholamian-Dehkordi, N., Luther, T., Asadi-Samani, M. & Mahmoudian-Sani, M.R. (2017) An overview on natural antioxidants for oxidative stress reduction in cancers; a systematic review *Immunopathol Persa*. 2017;3(2): e12.
43. Gilbert, D. L. (2000). Reactive oxygen species: From radiation to molecular biology: A Festschrift in Honor of Daniel L. Gilbert. *Journal of Molecular Biology*, 899(1), ix-xi, 1-424.
44. Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5).
45. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 186, 1–85.
46. Hermosín, I., Chicón, R. & Cabezudo, M.D. (2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. Volume 83, Issue 2, November 2003, Pages 263-268.

47. Hilary, S., Habib, H., Souka, U., Ibrahim, W., & Platat, C. (2017). Bioactivity of arid region honey: An in vitro study. *BMC Complement Altern Med*, 17, 177.
48. Iglesias, M.T., De Lorenzo, C., Del Carmen Polo, M., Martín Alvarez, P.J. & Pueyo, E. (2004) Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *J Agric Food Chem* 2004:52:84 9.
49. Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., Di Criscio, D. & De Cristofaro, A. (2022) Functional Properties and Anti-microbial Activity from Lactic Acid Bacteria as Resources to Improve the Health and Welfare of Honey Bees. *Insects* 2022 Mar 21;13(3):308.
50. Jamshidi-Kia, F., Priyanto Wibowo, J., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhassanzadeh, Z. & Lorigooini, Z. (2020) *Journal of HerbMed Pharmacology*, Volume 9, Issue number 3.
51. Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: Comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*, 62, 231-236.
52. Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., & Gallego, M. (2011). Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. *Talanta*, 84(3), 924-930.
53. Kamaruzaman, N.A., Sulaiman, S.A., Kaur, G. & Yahaya, B. (2014) Inhalation of honey reduces airway inflammation and histopathological changes in a rabbit model of ovalbumin-induced chronic asthma. *BMC Complementary and Alternative Medicine* volume 14, Article number: 176.
54. Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 28, 141-143.
55. Khalil, M.I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M. & Islam M.A. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199-11215.
56. Khalil, M.I. & Sulaiman S.A. (2010). The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: A review. *Afr J Tradit Complement Altern Med*.
57. Kikowska, M., Dworacka, M., Kędziora, I. & Thiem, B. (2016) *Eryngium creticum* – ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological activity. A review. *Rev. bras. farmacogn.* 26.

58. Kocyigit, A., Aydogdu, G., Balkan E., Yenigun, V.B., Guler, E.M., Bulut, H., Koktasoglu, F., Gören, A.C. & Atayoglu, A.T. (2019) Quercus pyrenaica Honeydew Honey With High Phenolic Contents Cause DNA Damage, Apoptosis, and Cell Death Through Generation of Reactive Oxygen Species in Gastric Adenocarcinoma Cells Integrative Cancer Therapies, Volume 18: 1–12.
59. Kuropatnicki, A., Klósek, M. & Kucharzewski, M. (2018) Honey as medicine: historical perspectives, Journal of Apicultural Research, 57:1, 113-118.
60. Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S. & Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 35(3), 676-692.
61. Magdas, D. A., Guyon, F., Puscas, R., Vigouroux, A., Gaillard, L., Dehelean, A., Feher, I., & Cristea, G. (2021). Applications of emerging stable isotopes and elemental markers for geographical and varietal recognition of Romanian and French honeys. Food Chemistry, 334, 127599.
62. Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2007). Analytical Methods for the Determination of Organic Acids in Honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(3), 3-11.
63. Meister, A. & Anderson, M. E. (2018). Glutathione. Annual Review of Biochemistry, 89, 755-782.
64. Missio da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Oliveira Costa, A.C. & Fett, R. (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chemistry. Volume 196, 1 April 2016, Pages 309-323.
65. Mittal, D., Gubin, M., Schreiber, R. & Smyth, M. (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. Current Opinion in Immunology. Volume 27, April 2014, Pages 16-25.
66. Mittler, R. (2017) 'ROS Are Good'. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
67. Moreira, R., Fernandes, F., Valentão, P., Pereira, D. M., & Andrade, P. B. (2020). Echium plantagineum L. honey: Search of pyrrolizidine alkaloids and polyphenols, anti-inflammatory potential and cytotoxicity. Food Chemistry, 328.
68. Motoyama, M., Hojo, H. & Watanabe, H. (1986) Comparison of Seven Cell Lines Derived from Human Gastric Carcinomas. Pathology International, Volume 36, Issue 1 p. 65-83.
69. Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo

- 13, 295 – 66 Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295.
70. Nainu, F., Masyita A., Bahar, M.A., Raihan, M., Prova, S.R, Mitra, S., Emran, T.B. & Simal-Gandara J. (2021) Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties *Antibiotics* 2021, 10(7), 822.
71. Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A. I., & Dodd, S. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 11(6), 851-876.
72. 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*. Volume 282, 10 January 2022, 114614.
73. Oyefuga, O.H., Ajani, E.O., Salau, B.A., Agboola, F.O. & Adebawo, O. (2012). Honey consumption and its antiageing potency in white Wister albino rats. *Sch J Biol Sci*.
74. Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X. & Estevinho, L.M. (2014) Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 63, January 2014, Pages 233-239.
75. Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*, 357, 83-86.
76. Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Tomuş, L. I., Bonta, V., Țăpăluş, A., & Buttstedt, A. (2014). Comparison between local and commercial royal jelly: Use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameters. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 116-123.
77. Poljsak, B. & Milisav, I. (2012) The neglected significance of ‘Antioxidative Stress’, *Oxid. Med. Cell. Longev.*
78. Poljsak, B., Suput, D. & Milisav, I. (2013) Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013.

79. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607.
80. Rahman, M.J., Costa de Camargo, A. & Shahidi, F. (2018) Phenolic profiles and antioxidant activity of defatted camelina and sophia seeds. *Food Chemistry*. Volume 240, 1 February 2018, Pages 917-925.
81. Rahman, M.M., Gan, S.H. & Khalil, I. (2014) Neurological Effects of Honey: Current and Future Prospects Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2014.
82. Ramanathan S., Mohammad S., Tantsis, E., Nguyen, T.K., Merheb, V., Fung V., White, O.B., Broadley, S., Lechner-Scott, J, Vucic, S., Henderson, A., Barnett, M.H., Reddel, S., Brilot, F. & Dale, R. (2018). Clinical course, therapeutic responses and outcomes in relapsing MOG antibody-associated demyelination. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. Volume 89, Issue 2.
83. 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.
84. Rani, V., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K., & Yadav, U.C.S. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183-193.
85. Reczek, C. & Chandel N. (2015) ROS- dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*. Volume 33, April 2015, Pages 8-13.
86. Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M. & Aggarwal, B. (2018) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 49, Issue 11, 1 December 2010, Pages 1603-1616.
87. Samarghandian, S., Afshari, J.T. & Davoodi, S. (2011) Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Pharmacogn Mag*. 2011 Jan-Mar; 7(25): 46–52.
88. Sart, S., Song, L. & Li, Y. (2015) Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation, *Reactive Oxygen Species in Stem Cells*. Volume 2015.
89. Schieber, M. & Chandel, N. (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*. Volume 24, Issue 10, 19 May 2014, Pages 453-462.
90. 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.
91. Schmitt-Schillig, S., Schaffer, S., Weber, C.C., Eckert, G.P. & Muller, W.E. (2005) “Flavonoids and the aging brain,” *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 56, no. 1, pp. 23–36.
 92. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., & Lankin, V. Z. (2021). Hydroperoxide-Reducing Enzymes in the Regulation of Free-Radical Processes. *Biochemistry (Moscow)*, 86, 1256–1274.
 93. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.
 94. Singh, A., Kukreti, R., Saso L. & Kukreti, S. (2019) Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24, 1583.
 95. Skaperda, Z., Argyriadou, A., Nechalioti, P. M., Alvanou, M., Makri, S., Bouroutzika, E., Kyriazis, I. D., Tekos, F., Veskoukis, A. S., Kallitsis, T., et al. (2021). Redox biomarker baseline levels in cattle tissues and their relationships with meat quality. *Antioxidants (Basel)*, 10(6), 958.
 96. Soldatkin, O. O., Peshkova, V. M., Saiapina, O. Y., Kucherenko, I. S., Dudchenko, O. Y., Melnyk, V. G., Vasylenko, O. D., Semenycheva, L. M., Soldatkin, A. P., & Dzyadevych, S. V. (2013). Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*, 115, 200-207.
 97. Takahashi, J. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics* volume 18, pages 164–179.
 98. Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O.S., Tastemur, B., Sagdic, O., Dogan, M. & Kayacier, A. (2013) Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. Volume 46, April 2013, Pages 124-131.
 99. Traber, M. G., & Atkinson, J. (2020). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 157, 222-236.
 100. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemicobiological interactions* 160, 1–40.
 101. Veskoukis, A., Kerasiotti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S. & Kouretas D. (2018). A battery of translational biomarkers for the assessment of

- the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology* 2018.
102. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J.A. (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, Volume 73, Issue 9 p. 117-124.
 103. Wang, S., Yang, H., Wei, J., & Wang, C. (2020). Comprehensive evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity in different floral origin honeys using ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC–QTOF-MS). *Food Chemistry*, 309, 125699.
 104. Weinreich, J., Schott, T. C., Königsrainer, I., Küper, M., Königsrainer, A., & Schott, H. (2012). Cytostatic Activity of a 5-Fluoro-2'-deoxyuridine–Alendronate Conjugate against Gastric Adenocarcinoma and Non-malignant Intestinal and Fibroblast Cell Lines. *Anticancer Research*, 32(10), 4299-4305.
 105. Willett W.C. (2006) The Mediterranean diet: science and practice, *Public Health Nutr.* A 9 105e110.
 106. Yapucu Güneş, Ülkü; Eşer & İsmet (2007) Effectiveness of a Honey Dressing for Healing Pressure Ulcers. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing* 34(2): p 184-190, March 2007.
 107. Yusop, S.A.T.W., Sukairi, A.H., Wan Sabri, W.M.A., & Asaruddin, M. R. (2019). Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity activities of propolis from Beladin, Sarawak stingless bees *Trigona itama* extract. *Materials Today: Proceedings*, 19, 1752-1760.
 108. Zuluaga, C., Serrato, J., & Quicazan, M. (2015). Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 79-84.
 109. Παπαγαλάνης, Ν., (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα I. Δραστικές ρίζες οξυγόνου 26, 151–194.