



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΜΕΛΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ
ΙΟΥ COXSACKIE**

ΠΕΡΚΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2020

Μελέτη της αντι-ϊκής δράσης ελληνικών μελιών έναντι του ιού Cocksackie
Study of the antiviral activity of Greek honeys against Cocksackie virus

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

Συμβασιούχος Διδάσκων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας-Ιολογίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημητρίου τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη και τη καθοδήγηση που μου παρείχε, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη αρωγή του Συμβασιούχου Διδάσκοντα Δημητρίου Τηλέμαχου, στον οποίο οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ για τις χρήσιμες συμβουλές, την υπομονή και τη συνεχή συνδρομή που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμη, θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την φιλία τους, τη συμπαράσταση και τη συνεργασία τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Το μέλι	11
1.2. Σύσταση μελιού	12
1.2.1. Υδατάνθρακες	12
1.2.2. Οργανικά οξέα	13
1.2.3. Ένζυμα	14
1.2.4. Μεταλλικά στοιχεία	15
1.2.5. Αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες	15
1.2.6. Φλαβονοειδή – Πολυφαινόλες	16
1.2.7. Μικροοργανισμοί	16
1.3. Ευεργετικές ιδιότητες του μελιού για τον άνθρωπο	17
1.3.1. Θρεπτική αξία	17
1.3.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες	17
1.3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα	21
1.3.4. Αντιφλεγμονώδης ικανότητα	21
1.3.5. Γαστρεντερολογικές επιδράσεις	22
1.3.6. Επούλωση πληγών	22
1.3.7. Καρδιαγγειακές παθήσεις	23
1.4. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού	24
1.4.1. Γεύση και άρωμα	24
1.4.2. Περιεκτικότητα σε νερό	25
1.4.3. Χρώμα	25
1.4.4. Κρυστάλλωση	26
1.4.5. Ηλεκτρική αγωγιμότητα	26
1.4.6. Ιξώδες	27
1.5. Τα είδη μελιού	27
1.5.1. Μέλι θυμαριού	28
1.5.2. Μέλι πορτοκαλιάς	29
1.5.3. Μέλι βαμβακιού	29
1.5.4. Μέλι ερείκης	29
1.5.5. Μέλι γλυκάνισου	29
1.5.6. Μέλι καστανιάς	30
1.5.7. Μέλι πεύκου	30
1.5.8. Μέλι ελάτης	30
1.6. Το μέλι Manuka	31
1.7. Ιικό στέλεχος Coxsackie B5	34
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37

3.1.	Δείγματα μελιού	37
3.1.1.	Μέλι Manuka	38
3.1.2.	Συνθετικό Μέλι	38
3.2.	Πειραματικό στέλεχος	39
3.3.	Κυτταροκαλλιέργειες	39
3.4.	Καλλιέργεια ιών και μέτρηση ιικού τίτλου	40
3.5.	Προετοιμασία αραιώσεων δειγμάτων μελιού και έλεγχος τοξικότητας	41
3.5.1.	Αρχικές προσεγγίσεις	41
3.5.2.	Έλεγχος τοξικότητας σε μικρότερες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού	42
3.6.	Ενοφθαλισμός ιού σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία των δειγμάτων μελιού και μελέτη αντι-ϊκής δράσης των δειγμάτων	44
3.7.	Εκχύλιση του ιικού RNA	45
3.8.	Αντίστροφη μεταγραφή	46
3.9.	Real-Time PCR	47
3.10.	Υπολογισμός τιμών CC_{50}, IC_{50} και SI	49
3.10.1.	Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC_{50})	49
3.10.2.	Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC_{50})	49
3.10.3.	Υπολογισμός δείκτη επιλεκτικότητας (SI)	50
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1.	Αποτελέσματα τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων Rd	50
4.1.1.	Τοξικότητα των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3,125% v/v	50
4.1.2.	Τοξικότητα των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 30 mg/ml	51
4.1.3.	Τιμές CC_{50} των δειγμάτων	53
4.2.	Αποτελέσματα αντι-ϊκής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού CVB5	54
4.2.1.	Κυτταροπαθογόνος δράση στα μολυσμένα με ιό δείγματα	54
4.2.2.	Αποτελέσματα qPCR και τιμές IC_{50} των δειγμάτων	55
4.2.3.	Τιμές SI των δειγμάτων	58
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατροφική και θεραπευτική αξία του μελιού είναι γνωστή και εκτιμάται από τον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι ευεργετικές επιδράσεις του μελιού έναντι μιας πληθώρας παθήσεων και παθογόνων μικροοργανισμών έχουν επανέλθει στο προσκήνιο και μελετώνται επισταμένα σε εργαστηριακές και κλινικές δοκιμές. Το μέλι φαίνεται να εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, καρδιοπροστατευτική και επουλωτική έναντι πληγών δράση, μεταξύ άλλων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι *in vitro* μελέτες που υποδεικνύουν αντιμικροβιακή δραστικότητα του μελιού έναντι ενός πλήθους παθογόνων, βακτηρίων, ιών και μυκήτων.

Στην παρούσα εργασία οκτώ (8) ελληνικά μέλια από διάφορες περιοχές και βοτανικές πηγές μελετήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις τους ως προς την αντι-ική τους δράση έναντι στελέχους εντεροϊού Coxsackie B5 και, παράλληλα, ως προς την τοξικότητα τους έναντι κυτταρικής σειράς ραβδομυοσαρκώματος (Rd). Οι παραπάνω ιδιότητες των ελληνικών μελιών συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες δείγματος συνθετικού μελιού, ενός εργαστηριακά παρασκευασμένου μείγματος σακχάρων, αλλά και δείγματος μονοανθικού μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί επισταμένα παγκοσμίως και έχει δείξει προστατευτική δράση έναντι ενός μεγάλου εύρους παθογόνων.

Στο πειραματικό μέρος, για τον προσδιορισμό της αντι-ικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκε, μετά από εκχύλιση του ιικού RNA και αντίστροφη μεταγραφή προς cDNA, μια συγκριτική ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (comparative Real-Time PCR) με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό της επίδρασης των δειγμάτων μελιού στη μεταβολή του αριθμού των ιικών αντιγράφων. Ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας που προκάλεσαν τα δείγματα μελιού έγινε με βάση την οπτικά παρατηρηθείσα καταστροφή των κυττάρων Rd (cytopathic effect, CPE) κάτω από μικροσκόπιο. Επιπλέον, για όλα τα δείγματα υπολογίστηκαν οι τιμές CC_{50} (50% cytotoxic concentration), IC_{50} (50% inhibitory concentration) και SI (selectivity index).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν, με μόνη εξαίρεση το συνθετικό μέλι, εμφάνισαν αντι-ική δράση έναντι του CVB5 στην κυτταρική σειρά Rd, αν και δραστικότητα ποίκιλλε μεταξύ των δειγμάτων. Η συγκέντρωση των μελιών που γενικά προκάλεσε το καλύτερο αντι-ικό αποτέλεσμα ήταν τα 10 mg/ml, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δείγμα μελιού

Γλυκάνισου προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση στα ιικά αντίγραφα ως προς τον θετικό μάρτυρα σε σχέση με το μέλι Manuka στη συγκέντρωση αυτή. Σε ό,τι αφορά την μελέτη τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων Rd, αυτή πραγματοποιήθηκε παράλληλα με την μελέτη της αντι-ιικής δράσης τους. Εξετάστηκαν διάφορες αραιώσεις μελιού και προέκυψε ότι περισσότερο ασφαλείς για τα κύτταρα είναι γενικά συγκεντρώσεις μικρότερες από 20 mg/ml.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα εργασία για πρώτη φορά μελετάται η αντι-ιική δράση μελιών, ιδιαίτερα ελληνικών και σε σύγκριση με το μέλι Manuka, έναντι του ιού Coxsackie B5, καθώς και η τοξική τους επίδραση σε κυτταρική σειρά Rd. Η μοναδική επίδραση του μελιού Manuka έναντι παθογόνων ιών επιβεβαιώθηκε εκ νέου στην παρούσα εργασία και η ισχυρή, συγκρινόμενη με του Manuka, αντι-ιική δράση που διαπιστώθηκε για ορισμένα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν τονίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

ABSTRACT

The nutritional and therapeutic value of honey has been known and appreciated by humans for thousands of years. In recent decades, the beneficial effects of honey on a variety of diseases and pathogens have been brought to the forefront and are being studied extensively in laboratory and clinical trials. Honey appears to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and wound healing activities, among others. Of particular interest are *in vitro* studies indicating the antimicrobial activity of honey against a host of pathogens (bacteria, viruses and fungi).

In the present study, eight (8) Greek honeys from different regions and botanical sources were tested at various concentrations for their antiviral activity against a Coxsackie B5 virus strain and, at the same time, for their toxicity against a Rhabdomyosarcoma (RD) cell line. The aforementioned properties of Greek honeys were compared with those of a sample of artificial honey, a laboratory-made mixture of sugars, and a sample of unifloral Manuka honey, which has been studied extensively worldwide and has displayed protective action against many pathogens.

In the experimental part, a comparative Real-Time PCR was performed, after the viral RNA extraction and reverse transcription to cDNA, for the determination of the honeys' antiviral activity and their precise effect on the number of viral copies. The cytotoxicity caused by the honey samples was determined based on the visually observed changes in the morphology of Rd cells (cytopathic effect, CPE) under a microscope. In addition, the CC_{50} (50% cytotoxic concentration), IC_{50} (50% inhibitory concentration) and SI (selectivity index) values were calculated for all samples.

The results showed that all honey samples tested, with the exception of synthetic honey, displayed antiviral activity against CVB5 in Rd cells, although the effect varied among the samples. The honey concentration that generally caused the best antiviral effect was 10 mg/ml, while it is noteworthy to mention that the Anise honey sample caused a greater reduction in viral copies (in relation to the positive control) than Manuka honey at the same concentration. Regarding the toxicity study of honey samples against Rd cells, this was performed in parallel with the study of their antiviral activity. Various dilutions of honey were tested and concentrations smaller than 20 mg/ml were found to generally be safer for cells.

In conclusion, in the present work for the first time Greek honeys are studied and compared with Manuka honey as for their antiviral activity against a Coxsackie B5

virus strain and as for their toxic effect against an Rd cell line. The unique effect of Manuka honey against pathogenic viruses has been reaffirmed in the present work, and the potent antiviral activity that was determined for some Greek honeys highlights the need for further research.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το μέλι

Σύμφωνα με την Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, ως μέλι ορίζεται «η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν». Διακρίνεται, δε, ανάλογα με την προέλευση, σε μέλι ανθέων (νέκταρος) που λαμβάνεται από το νέκταρ φυτών και σε μέλι μελιτώματος που προέρχεται από τα εκκρίματα των εντόμων που απομυζούν φυτά ή από τις εκκρίσεις των ίδιων των φυτών (Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2001).

Τα δύο αυτά είδη μελιού εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα ως προς τη χημική σύνθεση και τη γεύση, που θα εξεταστούν αναλυτικά παρακάτω (Aparna & Rajalakshmi, 1999).

Για την παραγωγή του μελιού οι μέλισσες, χρησιμοποιώντας μια μακρά, σωληνοειδή προβοσκίδα συλλέγουν το νέκταρ, ένα πλούσιο σε σάκχαρα υγρό, από τα άνθη των φυτών. Το νέκταρ αποτελείται κυρίως από νερό και περιέχει διαλυμένα σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, σε ποσοστό που ποικίλλει από 25-70% (Olaitan et al., 2007). Η χημική σύσταση του νέκταρος στη συνέχεια μεταβάλλεται, καθώς αναμειγνύεται με ένζυμα εκκρινόμενα από την μέλισσα. Η μέλισσα επιστρέφει στην κυψέλη, όπου μετά από μια διαδικασία παλινδρόμησης (regurgitation) μεταξύ μελισσών (βλ. Εικόνα 1.1.1) το νέκταρ εναποτίθεται στα κελιά της κηρήθρας. Μέσα στην κυψέλη, οι μέλισσες χρησιμοποιούν τα φτερά τους για να δημιουργήσουν ένα ρεύμα αέρα που επιταχύνει την εξάτμιση του νερού από το νέκταρ. Η εξάτμιση του νερού από τον



Εικόνα 1.1.1: Διαδικασία παλινδρόμησης (regurgitation) μεταξύ μελισσών

ζαχαρούχο χυμό είναι σημαντική, καθώς η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ζυμομύκητα και έναρξη της διαδικασίας ζύμωσης των σακχάρων (Chen, 2019). Η συμπύκνωση που πραγματοποιείται από τις μέλισσες

αποτρέπει την ανάπτυξη ζυμομύκητα και αρκετών άλλων βακτηρίων (Olaitan et al., 2007). Όταν το μέλι συμπυκνωθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, με περιεκτικότητα σε νερό περίπου 17% (Olaitan et al., 2007), οι μέλισσες σφραγίζουν το κελί με κηρό (Ediriweera & Premarathna, 2012). Το κελί αποσφραγίζεται αργότερα όταν οι μέλισσες θελήσουν να καταναλώσουν το μέλι (Olaitan et al., 2007).

Επιπλέον, οι μέλισσες εκκρίνουν το ένζυμο ινβερτάση από τους υποφαρυγγικούς τους αδένες, το οποίο μετατρέπει την σακχαρόζη που βρίσκεται στο νέκταρ σε φρουκτόζη και γλυκόζη, που αποτελούν και τους βασικούς υδατάνθρακες του μελιού (Crane, 1999).

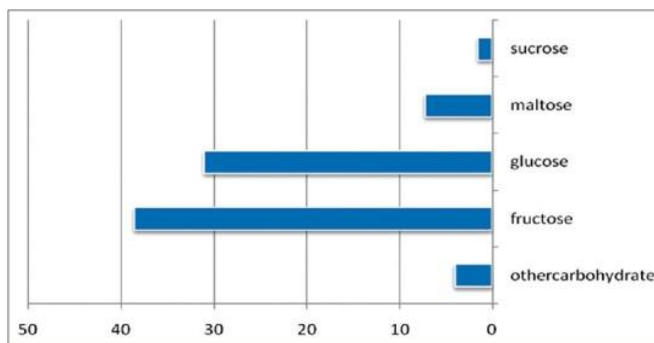
1.2. Σύσταση μελιού

Περίπου 300 ποικιλίες μελιού έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, οι οποίες διαφέρουν ως προς το νέκταρ που συλλέγουν οι μέλισσες για την παρασκευή του. Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του κάθε μελιού εξαρτάται από την ανθική του πηγή καθώς και από τις κλιματικές και γεωγραφικές συνθήκες στον τόπο συλλογής του (Ajibola et al., 2012; Samarghandian et al., 2017).

1.2.1. Υδατάνθρακες

Γενικά, όλα τα μέλια περιέχουν συνολικά περίπου 200 ουσίες, ωστόσο τα βασικά συστατικά τους είναι οι υδατάνθρακες, που συνιστούν τουλάχιστον το 95% του ξηρού τους βάρους, και το νερό (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Οι σημαντικότερες φυσικοχημικές και θρεπτικές ιδιότητες του μελιού, όπως η γλυκύτητα, το ιξώδες, η οσμωτική πίεση και η ενεργειακή του αξία, εξαρτώνται από τη σύνθεση των σακχάρων που περιέχει (Machado De-Melo et al., 2018).

Οι δύο κύριοι υδατάνθρακες που περιέχονται στο μέλι είναι οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη, σε ποσοστό περίπου 35% και γλυκόζη, σε ποσοστό περίπου 30% (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Τα δύο αυτά σάκχαρα

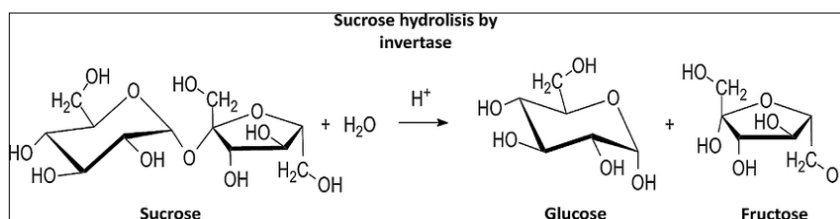


παράγονται από τις μέλισσες κατά τη διάρκεια της

Εικόνα 1.2.1.1: Οι βασικοί υδατάνθρακες του μελιού (μέση ποσότητα ανά 100 gr)

διαδικασίας ωρίμανσης του μελιού, όταν η ινβερτάση που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες των μελισσών μετασχηματίζει την σακχαρόζη που περιέχεται στο νέκταρ (βλ. Εικόνα 1.2.1.2) (Machado De-Melo et al., 2018). Η ινβερτάση παράγει επίσης και πιο πολύπλοκα σάκχαρα και περισσότεροι από 45 δι-, τρι- και

άλλοι ολιγο-σακχαρίτες έχουν ανιχνευθεί στο μέλι σε μικρές ποσότητες (5-15%) (Machado



Εικόνα 1.2.1.2: Η ενζυμική αντίδραση της ινβερτάσης

De-Melo et al., 2018), όπως μαλτόζη, σουκρόζη και μαλτοτριόζη μεταξύ άλλων (Samarghandian et al., 2017). Οι αναλογίες μεταξύ ορισμένων από αυτές τις ενώσεις έχουν προταθεί ως κατάλληλοι δείκτες για τη διαπίστωση της αυθεντικότητας του μελιού, καθώς τα μέλια ανθέων εμφανίζουν αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης περίπου 1,0, ενώ στα μέλια μελιτώματος η αναλογία αυτή κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 2,0 (Machado De-Melo et al., 2018).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, για τη διάθεσή του στο εμπόριο το μέλι νέκταρος θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 60gr φρουκτόζης και γλυκόζης συνολικά (το μέλι μελιτώματος ή μείγμα των δύο τουλάχιστον 45gr) και όχι περισσότερο από 5-10gr σακχαρόζης, ανά 100gr (Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2001).

1.2.2. Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα, με κύριο το γλυκονικό οξύ, συνιστούν περίπου το 0,5% του μελιού και κυρίως ευθύνονται για την οξύτητα και την χαρακτηριστική του γεύση

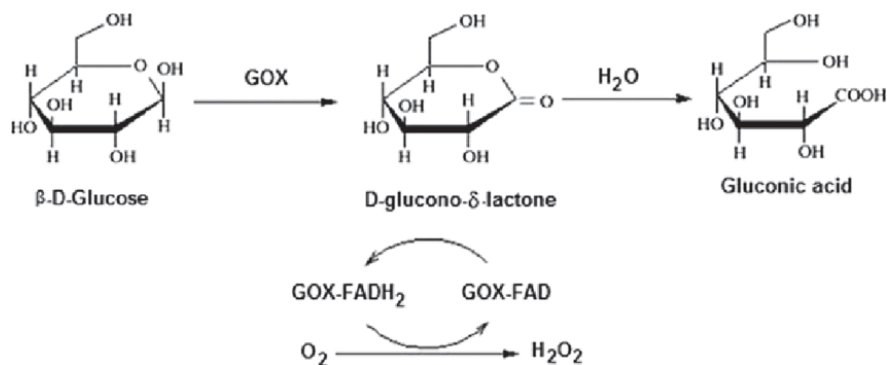
(Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Η συντριπτική τους πλειοψηφία παράγεται από τα σάκχαρα που περιέχονται στο νέκταρ ή το μελίτωμα με τη δράση των ενζύμων που εκκρίνονται από τις μέλισσες, αλλά ορισμένα οργανικά οξέα, όπως το κιτρικό, το μηλικό και το οξαλικό, μπορεί να προέρχονται απευθείας από το νέκταρ ή το μελίτωμα (Machado De-Melo et al., 2018).

Το γλυκονικό οξύ παράγεται από τη γλυκόζη με τη δράση της οξειδάσης της γλυκόζης και αποτελεί το κύριο οργανικό οξύ που περιέχεται στο μέλι αντιπροσωπεύοντας το 70-90% του συνόλου. Στο μέλι έχουν βρεθεί επίσης περισσότερα από 30 διαφορετικά μη αρωματικά οργανικά οξέα, όπως οξικό, βουτυρικό, μυρμηκικό, γαλακτικό, φουμαρικό, ηλεκτρικό και πυροσταφυλικό (Machado De-Melo et al., 2018).

1.2.3. Ένζυμα

Το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες ενζύμων, από τα οποία η οξειδάση της γλυκόζης, η ινβερτάση και η διαστάση είναι τα πιο σημαντικά. Άλλα ένζυμα που έχουν βρεθεί στο μέλι είναι η όξινη φωσφατάση, η καταλάση και η β-γλυκοσιδάση. Η ινβερτάση και η οξειδάση της γλυκόζης εκκρίνονται κυρίως από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών με σκοπό να συμβάλλουν στη διαδικασία ωρίμανσης του νέκταρος και τη μετατροπή του σε μέλι, ενώ ένζυμα όπως η καταλάση και η όξινη φωσφατάση προέρχονται από το νέκταρ, το μελίτωμα ή τη γύρη και άλλα, όπως η διαστάση, έχουν διπλή προέλευση (Machado De-Melo et al., 2018).

Η οξειδάση της γλυκόζης αρχικά αποικοδομεί τη γλυκόζη προς γλυκονολακτόνη και τελικά παράγεται γλυκονικό οξύ και μικρές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου, με την αντίδραση να συμβαίνει ταχύτερα στο μη ώριμο ή στο αραιωμένο μέλι. (βλ. Εικόνα 1.2.3.1) Το υπεροξείδιο του υδρογόνου προστατεύει το μέλι από τις επιδράσεις των βακτηρίων, μέχρις ότου επιτευχθεί αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων και άρα οσμωτική πίεση. Όταν το μέλι δεν είναι αραιωμένο, η παρουσία του γλυκονικού οξέος μειώνει το pH και αναστέλλει έτσι την δραστηριότητα της οξειδάσης της γλυκόζης. Όπως έχει προαναφερθεί, η ινβερτάση που περιέχεται στο μέλι είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του νέκταρος ή του μελιτώματος σε μέλι, μέσω υδρόλυσης της σακχαρόζης σε φρουκτόζη, γλυκόζη και άλλους ολιγοσακχαρίτες (Machado De-Melo et al., 2018).



Εικόνα 1.2.3.1: Η αντίδραση που καταλύεται από την οξειδάση της γλυκόζης (*glucose oxidase*, GOX) και η παραγωγή γλυκονικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

Άλλα σημαντικά ένζυμα που εμφανίζονται στο μέλι σε μικρότερη ποσότητα είναι η καταλάση και η όξινη φωσφατάση, εκ των οποίων η καταλάση μετατρέπει το παραγόμενο από την οξειδάση της γλυκόζης υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Ένα άλλο ένζυμο, η β-γλυκοσιδάση, παράγεται από τις μέλισσες και μετασχηματίζει τις β-γλυκάνες σε ολιγοσακχαρίτες και γλυκόζη (Machado De-Melo et al., 2018).

1.2.4. Μεταλλικά στοιχεία

Η περιεκτικότητα του μελιού σε μεταλλικά στοιχεία είναι γενικά χαμηλή, κυμαινόμενη μεταξύ 0,02 και 0,3% επί του συνόλου στο μέλι ανθέων, και περίπου 1% στο μέλι μελιτώματος. Τα πιο σημαντικά μεταλλικά στοιχεία που περιέχονται στο μέλι είναι το κάλιο, που αποτελεί και το 80% περίπου του συνόλου, το νάτριο, το ασβέστιο και το μαγνήσιο, ενώ σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύονται στοιχεία όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, το χλώριο, το βόριο, ο φώσφορος, το θείο και το πυρίτιο, μεταξύ άλλων (Machado De-Melo et al., 2018).

Σε γενικές γραμμές, τα σκουρόχρωμα μέλια μελιτώματος περιέχουν περισσότερα μεταλλικά στοιχεία από τα ανοιχτόχρωμα και η περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία επηρεάζεται από παράγοντες όπως οι εδαφοκλιματικές συνθήκες και το νέκταρ που προέρχεται από τις διάφορες βοτανικές πηγές που εμπλέκονται στην παραγωγή του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018).

1.2.5. Αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες

Το μέλι περιέχει επίσης όλα τα απαραίτητα αμινοξέα καθώς και τα περισσότερα μη-απαραίτητα (Samarghandian et al., 2017). Περίπου 26 αμινοξέα έχουν ανιχνευθεί στο μέλι τα οποία προέρχονται είτε από τις εκκρίσεις των μελισσών είτε από τα φυτά, με την προλίνη να αποτελεί το πιο άφθονο ελεύθερο αμινοξύ στο μέλι σε ποσοστό 50-85% του συνόλου. Στο μέλι έχουν ταυτοποιηθεί επίσης περίπου 20 διαφορετικές μη ενζυμικές πρωτεΐνες, με το συνολικό ποσοστό να κυμαίνεται από 0,1 έως 0,5% (Machado De-Melo et al., 2018).

Χαμηλά είναι επίσης και τα επίπεδα βιταμινών που περιέχονται στο μέλι και προέρχονται κυρίως από τη γύρη των ανθέων ή το νέκταρ. Η πιο σημαντική βιταμίνη στο μέλι είναι η βιταμίνη C, ενώ έχουν επίσης ανιχνευθεί βιταμίνες της ομάδας B. Σε ένα μικρό ποσοστό στο μέλι, περίπου 0,04%, έχουν βρεθεί και λιπιδικές ενώσεις όπως στερόλες και φωσφολιπίδια και διάφορα οξέα όπως παλμιτικό, ελαϊκό, μυριστικό και λινελαϊκό, μεταξύ άλλων (Machado De-Melo et al., 2018).

1.2.6. Φλαβονοειδή – Πολυφαινόλες

Το μέλι περιέχει φλαβονοειδή και πολυφαινόλες, που αποτελούν βασικά βιοδραστικά συστατικά του και ευθύνονται κατά βάση για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Samarghandian et al., 2017). Τα φλαβονοειδή, με κύριες τις αγλυκόνες, προέρχονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% από την πρόπολη, αλλά μπορεί να προέρχονται και από τα φυτά ή τη γύρη (Machado De-Melo et al., 2018). Έχει επίσης αναφερθεί ότι το σκουρόχρωμο μέλι περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών απ'ότι το ανοιχτόχρωμο και άρα εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.2.7. Μικροοργανισμοί

Στο μέλι ανιχνεύονται επίσης μικροοργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν από την υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα μετά την συμπύκνωση του, την οξύτητα και τις αντιμικροβιακές του ουσίες και μπορεί να προέρχονται από τις ίδιες τις μέλισσες, το νέκταρ ή εξωτερικές πηγές. Τα πιο διαδεδομένα, μεταξύ άλλων, είναι βακτήρια του γένους *Bacillus*, αν και τα μικρόβια στο μέλι βρίσκονται γενικά σε αδρανή κατάσταση υπό τη μορφή σπορίων (Olaitan et al., 2007).

1.3. Ευεργετικές ιδιότητες του μελιού για τον άνθρωπο

Η διατροφική αξία και οι ευεργετικές ιδιότητες του μελιού είναι γνωστά στον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η αρχαιότερη καταγεγραμμένη αναφορά στο μέλι χρονολογείται περίπου 8.000 χρόνια πριν, όπως υποδηλώνεται από τοιχογραφίες της Εποχής του Λίθου. Οι μεγάλοι πολιτισμοί που ακολούθησαν, συμπεριλαμβανομένων των Μάγια, των Αιγυπτίων, των Ελλήνων και των Κινέζων, φαίνεται να κατανοούσαν και να εκτιμούσαν την διατροφική και φαρμακευτική αξία του μελιού, καθώς χρησιμοποιούσαν ευρέως το μέλι για κατανάλωση αλλά και ως φάρμακο, για παράδειγμα ως αλοιφή για την επούλωση πληγών (Samarghandian et al., 2017).

1.3.1. Θρεπτική αξία

Στη διατροφή του ανθρώπου το μέλι αποτελεί μια εξαιρετική πηγή ενέργειας, με μία μερίδα 20 γραμμαρίων μελιού να παρέχει περίπου 256,6 kJ (61,2 kcal) ενέργειας, που αντιπροσωπεύει περίπου το 3% της απαραίτητης ημερήσιας πρόσληψης. Το μέλι έχει προταθεί ως μια καλή τροφή για ανθρώπους όλων των ηλικιών, αφού βοηθά στην βελτίωση της υγείας των ηλικιωμένων αλλά και της απόδοσης των αθλητών, ως ένα καλά ανεκτό φαγητό και μια αποτελεσματική πηγή υδατανθράκων (Machado De-Melo et al., 2018).

Τα κύρια συστατικά του μελιού είναι οι απλοί υδατάνθρακες φρουκτόζη και γλυκόζη που μπορούν να απορροφηθούν γρήγορα στο αίμα, αλλά τα επίπεδα σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία που περιέχονται στο μέλι είναι αρκετά χαμηλά ώστε η συμβολή τους στις ανθρώπινες διατροφικές ανάγκες να θεωρείται μικρή (Machado De-Melo et al., 2018).

1.3.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες

Το 1892 ο Ολλανδός επιστήμονας Van Ketel υπήρξε ο πρώτος που αναγνώρισε την αντιβακτηριακή δράση του μελιού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

Σήμερα, έχει αναφερθεί ότι το μέλι εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι τουλάχιστον 60 ειδών βακτηρίων, αλλά και έναντι ιών και μυκήτων, ενώ μπορεί να δρα ως βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο ανάλογα με τη συγκέντρωση του (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται γενικά σε τέσσερα χαρακτηριστικά του: την υψηλή οσμωτικότητα, το χαμηλό pH, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και, τέλος, αρκετούς φυτοχημικούς παράγοντες (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

Η υψηλή οσμωτικότητα του μελιού οφείλεται στην μεγάλη συγκέντρωση σακχάρων, η οποία δρα ανασταλτικά για τα περισσότερα είδη βακτηρίων καθώς αφαιρεί νερό από το περιβάλλον και οδηγεί στην αφυδάτωσή τους (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Ωστόσο, για ορισμένα είδη βακτηρίων η υψηλή συγκέντρωση νερού λειτουργεί ανασταλτικά στην ανάπτυξη, οπότε η συνεισφορά του οσμωτικού φαινομένου στην βακτηριακή ανάπτυξη εξαρτάται από το είδος του βακτηρίου (Olaitan et al., 2007).

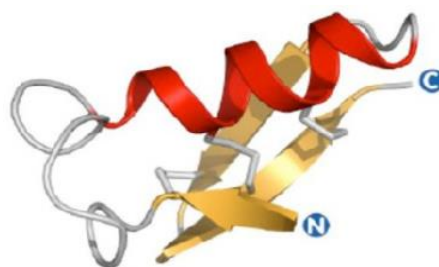
Το pH του μελιού είναι όξινο και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 4,6 για το μέλι νέκταρος και 4,5-6,5 για το μέλι μελιτώματος, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε μεταλλικά στοιχεία των τελευταίων (Machado De-Melo et al., 2018). Το χαμηλό αυτό pH λειτουργεί απαγορευτικά για τα περισσότερα είδη βακτηρίων, όπως για παράδειγμα για τα *E. coli*, *Salmonella* spp. και *P. aeruginosa*, καθώς είναι σημαντικά χαμηλότερο από το ιδανικό pH για την ανάπτυξή τους. Η οξύτητα οφείλεται στην ύπαρξη στο μέλι οργανικών οξέων, με κύριο το γλυκονικό οξύ (Olaitan et al., 2007).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) αποτελεί, μαζί με τους φυτοχημικούς παράγοντες, έναν από τους πιο σημαντικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες του μελιού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Τα αντιβακτηριακά συστατικά του μελιού μπορούν γενικά να χωριστούν σε αυτά που εμφανίζουν υπεροξειδική δράση και σε αυτά με μη-υπεροξειδική δράση (Machado De-Melo et al., 2018).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι το συστατικό υπεύθυνο για την υπεροξειδική αντιμικροβιακή δράση του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018) και παράγεται, όπως έχει προαναφερθεί, ενζυμικά στο μέλι μέσω της δράσης της οξειδάσης της γλυκόζης (Olaitan et al., 2007). Στους περισσότερους τύπους μελιού το H_2O_2 παράγεται κατά την αραίωση του μελιού, καθώς τότε ενεργοποιείται το ένζυμο και λαμβάνει χώρα η οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η διαφορετική περιεκτικότητα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου σε κάθε τύπο μελιού είναι αυτή που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή του δράση. Η συγκέντρωση του στο μέλι εξαρτάται από την σχετική δράση της οξειδάσης της γλυκόζης που παράγεται από τις μέλισσες, από τη μία, και της καταλάσης που προέρχεται από τη γύρη και το νέκταρ, από την άλλη (Mandal et al.,

2011). Η καταλάση είναι υπεύθυνη για την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της αντίδρασης: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί επίσης να εξουδετερωθεί κατόπιν αντίδρασης με ασκορβικό οξύ και μεταλλικά ιόντα (Olaitan et al., 2007), ή κατόπιν θέρμανσης (Mandal et al., 2011). Οι φυτοχημικοί παράγοντες που περιέχονται στο μέλι αναφέρονται συχνά ως μη-υπεροξειδιακοί παράγοντες και είναι επίσης υπεύθυνοι για την μοναδική αντιβακτηριακή δράση του μελιού. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τη λυσοζύμη, το αντιμικροβιακό πεπτίδιο bee defensin-1 και τη μεθυλγλυοξάλη (MGO) (Mandal et al., 2011). Η αντιμικροβιακή ένωση μεθυλογλυοξάλη βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα στο μονοανθικό μέλι Manuka που προέρχεται από τη Νέα Ζηλανδία και την Νοτιοανατολική Αυστραλία. Η μεθυλγλυοξάλη στο μέλι Manuka παράγεται από την μη-ενζυμική μετατροπή της διυδροξυακετόνης που περιέχεται στο νέκταρ των ανθέων του δέντρου Manuka (Linford, 2018). Η μεθυλγλυοξάλη έχει επίσης βρεθεί σε μέλια από διαφορετικές βοτανικές πηγές, αλλά οι συγκεντρώσεις της ήταν σημαντικά χαμηλότερες από εκείνη στο μέλι Manuka (Machado De-Melo et al., 2018). Μεθυλγλυοξάλη και διυδροξυακετόνη αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων μέσω καταστολής της ουρεάσης. Τα βακτήρια σε όξινο περιβάλλον χρησιμοποιούν την ουρεάση για παραγωγή αμμωνίας επιτρέποντας την ανάπτυξή τους, επομένως καταστολή της ουρεάσης αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων σε όξινο περιβάλλον, όπως είναι αυτό του μελιού (Ahmed et al., 2018).

Οι ντιφενσίνες ή αμυντίνες (defensins) θεωρείται επίσης ότι συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού. Πρόκειται για μια οικογένεια πλούσιων σε κυστεΐνη αντιμικροβιακών πεπτιδίων που συναντώνται σε δύο μορφές, αμυντίνη 1 και 2. Η αμυντίνη 1 διαθέτει 3 ισομορφές εκ των οποίων οι δύο βρίσκονται στον βασιλικό πολτό (royal jelly) και ονομάζονται royalisin. Το πεπτίδιο αυτό έχει βρεθεί ακόμη στον αιμόλεμφο και στους αδένες των μελισσών (Organ et al., 2016). Έχει αναφερθεί ότι σε μέλια στα οποία η μεθυλγλυοξάλη είχε εξουδετερωθεί, η royalisin εμφανίζει πρόσθετη αντιβακτηριακή δράση σε συνεργασία με συστατικά όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τα σάκχαρα και το



Εικόνα 1.3.2.1: Μοντέλο της αμυντίνης 1 από την *Apis mellifera*

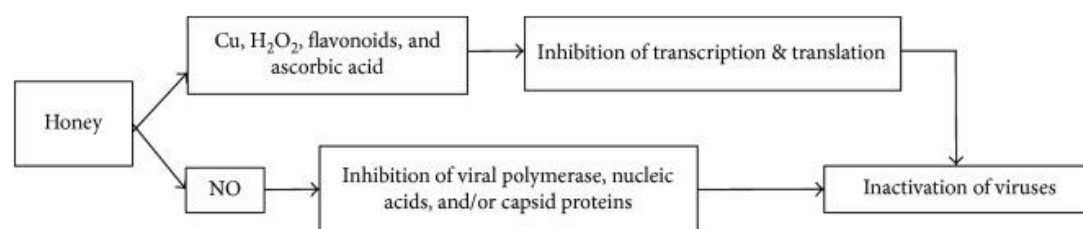
χαμηλό pH. Το πεπτίδιο bee defensin-1 εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένα των μελισσών και εμφανίζει ισχυρή δραστικότητα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Machado De-Melo et al., 2018).

Οι μη-υπεροξειδιακοί παράγοντες δεν καταστρέφονται από τη θερμότητα, το φως ή λόγω της αραίωσης του μελιού (Olaitan et al., 2007), και φαίνεται να αποτελούν την αιτία που το μέλι διατηρεί την αντιμικροβιακή του δράση ακόμα και απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου η οποία οφείλεται σε απουσία οξειδάσης της γλυκόζης ή έντονη παρουσία καταλάσης.

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού εξαρτάται γενικά από τις βοτανικές πηγές, τον μεταβολισμό των μελισσών και τις περιβαλλοντικές, εποχιακές και κλιματικές συνθήκες (Machado De-Melo et al., 2018).

Για την αντι-ική ειδικά δράση του μελιού, δεδομένα διαφόρων *in vitro* μελετών έδειξαν προστατευτική δράση του μελιού έναντι διαφορετικών τύπων ιών, όπως του ιού της Ερυθράς (Rubella) και του ιού του απλού έρπητα (Ahmed et al., 2018). Μια άλλη μελέτη σε μολυσμένα από ιό έρπητα ζωστήρα ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo) έδειξε μείωση των ιικών πλακών μετά από προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλιού (Shahzad & Cohrs, 2012).

Η αντι-ική δράση του μελιού αποδίδεται στα διάφορα συστατικά του όπως το ασκορβικό οξύ (βιτ. C), τα φλαβονοειδή και το υπεροξείδιο του υδρογόνου τα οποία οδηγούν σε διακοπή της διαδικασίας μεταγραφής και μετάφρασης και σε αναστολή της ανάπτυξης του ιού. Επιπλέον, ουσίες όπως το οξείδιο του νατρίου (NO), τα νιτρώδη και τα νιτρικά που εκκρίνονται από τους σιελογόνους αδένες της μέλισσας επιβραδύνουν την ανάπτυξη ιογενών δερματικών αλλοιώσεων και διακόπτουν την ιική αντιγραφή μέσω παρεμβολής στις πρωτεΐνες και το γενετικό υλικό του ιού (Ahmed et al., 2018). Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι το μέλι μειώνει την ικανότητα των ιών να λαμβάνουν σίδηρο από τον ξενιστή τους σταματώντας έτσι την μόλυνση (Machado De-Melo et al., 2018).



Εικόνα 1.3.2.2: Συνοπτική παρουσίαση μηχανισμών αντι-ικής δράσης του μελιού

1.3.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Ορισμένες από τις ουσίες που περιέχονται στο μέλι λειτουργούν συνεργαστικά για να παρέχουν αντιοξειδωτική δράση έναντι ελευθέρων ριζών και δραστικών ριζών οξυγόνου οι οποίες αλληλεπιδρούν με λιπίδια, πρωτεΐνες και το ίδιο το DNA των κυττάρων (Samarghandian et al., 2017) και προκαλούν μεταβολικές και καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (Ajibola et al., 2012).

Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στο περιεχόμενο του σε φαινολικά συστατικά, δηλαδή φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Αυτές οι ενώσεις, σε συνεργασία με τις μελανοϊδίνες, την οξειδάση της γλυκόζης, την καταλάση, τα καροτενοειδή, τα οργανικά οξέα, το ασκορβικό οξύ, τα αμινοξέα και τις πρωτεΐνες ευθύνονται για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018). Έχει επίσης ανιχνευθεί συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης και του χρώματος του μελιού, καθώς τα πιο σκούρα μέλια εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα πιο ανοιχτόχρωμα (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι το μέλι αυξάνει *in vivo* τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών όπως του β-καροτενίου, της βιταμίνης C και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Ahmed et al., 2018).

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης του μελιού έχει αναφερθεί ότι περιλαμβάνουν την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, την προσφορά υδρογόνου, τη δέσμευση μεταλλικών ιόντων και τη λειτουργία ως υποστρώματα για ρίζες υπεροξειδίου και υδροξειδίου (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.3.4. Αντιφλεγμονώδης ικανότητα

Η αντιφλεγμονώδης δράση του μελιού είναι καλά τεκμηριωμένη σε κυτταρικές καλλιέργειες, ζωικά μοντέλα και κλινικές δοκιμές και οφείλεται στα φαινολικά συστατικά του μελιού (Samarghandian et al., 2017). Συγκεκριμένα, το μέλι μειώνει τα επίπεδα κυτοκινών όπως η IL-6 και ο TNF- α καθώς και της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), των προσταγλανδινών και της κιτρικής συνθάσης (NOS) που εμφανίζουν φλεγμονώδεις επιδράσεις. Επιπλέον, μειώνει την έκφραση της MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) που ευθύνεται για χρόνιες φλεγμονές (Ahmed et al., 2018).

1.3.5. Γαστρεντερολογικές επιδράσεις

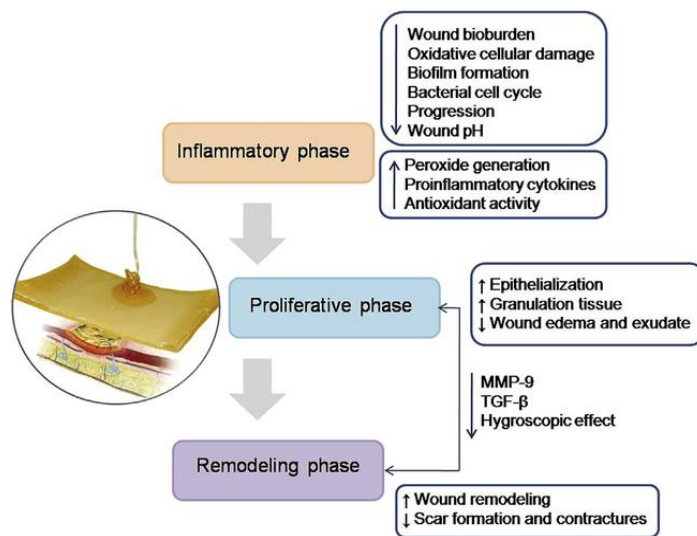
Έχουν υπάρξει αναφορές για την προστατευτική δράση του μελιού σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού συστήματος. Η επίδραση του για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του προκαλούμενου από βακτήρια και ροταϊούς γαστρικού έλκους (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013), της γαστρίτιδας και της γαστρεντερίτιδας είναι καλά τεκμηριωμένη (Ajibola et al., 2012) και σε κλινικές δοκιμές έχει βρεθεί ότι μειώνει σημαντικά την διάρκεια την διάρροιας σε βρέφη και παιδιά που πάσχουν από γαστρεντερίτιδα (Samarghandian et al., 2017). Ο μηχανισμός δράσης του πιθανώς περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της προσκόλλησης των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα γεγονός που αποτελεί και το πρώτο στάδιο για την έναρξη της μόλυνσης. Έχει, τέλος, αναφερθεί μια μέση αντιβακτηριακή επίδραση του μελιού έναντι του βακτηρίου *Helicobacter Pylori*, λόγω της παρουσίας του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.3.6. Επούλωση πληγών

Η επιδερμική εφαρμογή του μελιού για την επούλωση πληγών αποτελεί μια από αρχαιότερες και καλύτερα τεκμηριωμένες

θεραπευτικές χρήσεις του μελιού από τον άνθρωπο (Mandal et al., 2011). Η επούλωση της πληγής είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει την πήξη, την φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τελικά την αποκατάσταση του ιστού με

τη βλάβη (Ahmed et al., 2018). Το μέλι εμφανίζει θεραπευτικές επιδράσεις σε αρκετά από αυτά τα στάδια οι οποίες οφείλονται στην αντιβακτηριακή του δράση, στο υψηλό ιξώδες λόγω του οποίου το μέλι σχηματίζει ένα προστατευτικό φραγμό έναντι μολύνσεων γύρω από την πληγή αλλά και στην υγρασία που διατηρεί και



Εικόνα 1.3.6.1: Δράσεις του μελιού στα διάφορα στάδια της διαδικασίας επούλωσης πληγής (φλεγμονή, πολλαπλασιασμό, αποκατάσταση)

τη βλάβη (Ahmed et al., 2018). Το μέλι εμφανίζει θεραπευτικές επιδράσεις σε αρκετά από αυτά τα στάδια οι οποίες οφείλονται στην αντιβακτηριακή του δράση, στο υψηλό ιξώδες λόγω του οποίου το μέλι σχηματίζει ένα προστατευτικό φραγμό έναντι μολύνσεων γύρω από την πληγή αλλά και στην υγρασία που διατηρεί και

ενισχύει την διαδικασία επούλωσης (Mandal et al., 2011). Εμφανίζει καθαριστική δράση, προωθεί την ανάπλαση του ιστού και μειώνει την φλεγμονή (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το μέλι προωθεί την διέγερση και τον πολλαπλασιασμό των T- και B- λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των φαγοκυττάρων και την έκκριση κυτοκινών όπως του TNF- α και των ιντερλευκινών -1 β και -6, γεγονότα που ξεκινούν και επιταχύνουν την διαδικασία επούλωσης (Ahmed et al., 2018).

Η οξειδάση της γλυκόζης που περιέχεται στο μέλι οδηγεί στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου προσφέροντας αντιβακτηριακή δράση στα μακροφάγα (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου διεγείρει επίσης την αύξηση των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων και την παραγωγή πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων (NTF) για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επούλωση της πληγής (Ahmed et al., 2018). Επιπλέον, λόγω της οσμωτικής επίδρασης του μελιού αφαιρείται νερό μαζί με υπολείμματα και ακαθαρσίες από τον πάτο της πληγής, συμβάλλοντας στον καθαρισμό της, ενώ οι βιταμίνες και τα αμινοξέα που περιέχονται στο μέλι λειτουργούν ως θρεπτικά για την αναγέννηση του ιστού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.3.7. Καρδιαγγειακές παθήσεις

Το μέλι περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες όπως βιταμίνη C, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες που μειώνουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις. Ειδικότερα στην περίπτωση στεφανιαίας καρδιακής νόσου, τα φαινολικά συστατικά του μελιού εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική, αντι-ισχαιμική και αγγειοδιασταλτική προστατευτική δράση έναντι της ασθένειας. Ο μηχανισμός δράσης έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει την βελτίωση της στεφανιαίας αγγειοδιαστολής, την μείωση της ικανότητας των αιμοπεταλίων στο αίμα να πήξουν και την αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Samarghandian et al., 2017). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε υπέρβαρα άτομα βρέθηκε ότι κατανάλωση 70 γραμμαρίων μελιού για 30 ημέρες οδήγησε σε μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, της τριακυλογλυκερόλης και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), χωρίς παράλληλη αύξηση του σωματικού βάρους (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.4. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες-οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού, δηλαδή η γεύση, το άρωμα, το χρώμα και η ρευστότητα εξαρτώνται κυρίως από την γεωγραφική περιοχή και την βοτανική πηγή από την οποία οι μέλισσες συλλέγουν το νέκταρ καθώς και, σε μικρότερο βαθμό, από παράγοντες όπως η φυσιολογία των μελισσών και οι συνθήκες διατροφής τους, οι κλιματολογικές συνθήκες και η επεξεργασία του μελιού μετά την συλλογή του (Manγι-Loh et al., 2011).

Το τελικό προϊόν αποτελεί επί των πλείστων ένα μείγμα γεύσεων, καθώς οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ από οποιαδήποτε άνθος μπορούν να προσεγγίσουν και το μέλι στο εμπόριο διατίθεται ως πολυανθικό (mixed floral) με ένα μείγμα γεύσεων, συνεπώς η βοτανική του προέλευση είναι δύσκολο να προσδιοριστεί (Manγι-Loh et al., 2011).

Το μονοανθικό μέλι παράγεται από νέκταρ που προέρχεται εξ ολοκλήρου ή κυρίως από ένα μόνο είδος ή φυτό και, συνεπώς, αποτελείται από συγκεκριμένα πτητικά οργανικά συστατικά (VOCs), τα οποία και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ μονοανθικών μελιών από διαφορετικές βοτανικές πηγές, αντιπροσωπεύοντας ένα είδος «δακτυλικού αποτυπώματος» για τον κάθε τύπο μελιού. Η πτητική οργανική σύνθεση του κάθε μονοανθικού μελιού επηρεάζει εν τέλει σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κάθε τύπου μελιού (Manγι-Loh et al., 2011) και είναι κυρίως υπεύθυνη για το τελικό άρωμά του που συχνά καθορίζει και τις προτιμήσεις των καταναλωτών (Yijin et al., 2017). Γενικά, οι πτητικές οργανικές ενώσεις μπορούν να προέρχονται από την βοτανική πηγή, από τη μετατροπή ενώσεων από τον μεταβολισμό της μέλισσας, από τη θέρμανση ή το χειρισμό κατά τη διάρκεια επεξεργασίας και αποθήκευσης του μελιού ή από μικροβιακή ή περιβαλλοντική μόλυνση (Manγι-Loh et al., 2011).

1.4.1. Γεύση και άρωμα

Η γεύση και το άρωμα του μελιού εξαρτώνται από τα πτητικά συστατικά του καθώς και από τα περιεχόμενα σάκχαρα, οξέα, αμινοξέα και τανίνες (Machado De-Melo et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τη γεύση, η γλυκύτητα του μελιού οφείλεται στη φρουκτόζη και γλυκόζη που περιέχει, με την πρώτη να είναι πιο γλυκιά από τη σακχαρόζη και τη γλυκόζη. Το ανοιχτόχρωμο μέλι έχει πάντα πιο απαλή γεύση, ενώ

το σκουρόχρωμο πιο έντονη, επομένως το χρώμα του μελιού μπορεί να παρέχει πληροφορίες και για τη γεύση του (Aparna & Rajalakshmi, 1999).

1.4.2. Περιεκτικότητα σε νερό

Η ιδιότητα του μελιού να απορροφά και να κατακρατά υγρασία από το περιβάλλον ονομάζεται υγροσκοπικότητα (Olaitan et al., 2007). Μέλια διαφορετικών βοτανικών πηγών έχουν διαφορετικές τιμές υγρασίας, αλλά η υγρασία του μελιού συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 13 και 25%, ενώ βέλτιστη τιμή θεωρείται περίπου το 17% (Machado De-Melo et al., 2018). Η περιεκτικότητα σε νερό αποτελεί μια σημαντική ποιοτική παράμετρο, καθώς υψηλές τιμές μπορούν να επιταχύνουν την διαδικασία κρυστάλλωσης και να επιτείνουν τη δραστηριότητα ορισμένων οσμω-ανθεκτικών ζυμομυκήτων και εν γένει τη διαδικασία ζύμωσης, μειώνοντας έτσι τον χρόνο αποθήκευσης του μελιού (Abdulkhaliq & Swaileh, 2017). Από την άλλη, μέλια με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό είναι δύσκολο να χειριστούν και να επεξεργαστούν (Machado De-Melo et al., 2018).

1.4.3. Χρώμα

Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από άχρωμο και διαυγές έως σκούρο κεχριμπαρί ή μαύρο και γενικά εμφανίζεται σε όλες τις αποχρώσεις του κίτρινου. Λιγότερο συχνά παρατηρούνται απαλές αποχρώσεις του κόκκινου όπως αυτή που εμφανίζει το μέλι καστανιάς, ή γκριζωπές αποχρώσεις όπως του μελιού ευκαλύπτου. Το χρώμα του μελιού εξαρτάται από τη βοτανική του προέλευση, την ηλικία και τις συνθήκες αποθήκευσης, αλλά η διαύγεια του εξαρτάται από την ποσότητα των αιωρούμενων σωματιδίων, όπως η γύρη (Olaitan et al., 2007). Οι πιο σημαντικές χρωστικές υπεύθυνες για το χρώμα του μελιού είναι οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή, οι ξανθοφύλλες και οι ανθοκυανίνες, ενώ τα σάκχαρα, τα μεταλλικά στοιχεία και τα αμινοξέα μπορούν επίσης να συμβάλλουν στο χρώμα (Machado De-Melo et al., 2018).



Εικόνα 1.4.3.1: Το χρώμα του μελιού ποικίλλει και εμφανίζεται σε διάφορες αποχρώσεις

Το χρώμα συσχετίζεται επίσης άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού, καθώς έχει βρεθεί ότι σκουρόχρωμα μέλια εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα πιο ανοιχτόχρωμα (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Τα σκουρόχρωμα μέλια διαθέτουν επίσης περισσότερα μεταλλικά στοιχεία και δεξτρίνες (Machado De-Melo et al., 2018). Μόλις κρυσταλλωθεί, το μέλι γίνεται γενικά πιο ανοιχτόχρωμο, καθώς οι κρύσταλλοι γλυκόζης είναι λευκοί (Olaitan et al., 2007).

1.4.4. Κρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση του μελιού οφείλεται στο σχηματισμό ποικίλου μεγέθους και σχήματος κρυστάλλων γλυκόζης, ανάλογα με τη σύσταση και τις συνθήκες αποθήκευσής του (Olaitan et al., 2007) και είναι μια φυσική και αυθόρμητη διαδικασία. Η γλυκόζη, όντας λιγότερο διαλυτή από τη φρουκτόζη, διαχωρίζεται από το νερό, κατακρημνίζεται και κρυσταλλοποιείται με παράλληλη απώλεια νερού (Machado De-Melo et al., 2018).



Εικόνα 1.4.4.1: Η κρυστάλλωση του μελιού είναι μια φυσική διαδικασία

Η έναρξη της διαδικασίας κρυσταλλοποίησης διευκολύνεται σε θερμοκρασίες 5-7°C, ενώ για την ανάπτυξη των κρυστάλλων το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών κυμαίνεται μεταξύ 10 και 18°C. Θερμοκρασίες υψηλότερες από 25 °C επιτρέπουν τη διάλυση τους. Η κρυσταλλοποίηση ευνοείται επίσης σε περιεκτικότητα σε υγρασία 15-18% καθώς και σε υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (μεγαλύτερη από 28-30%) και μελεσιτόζη (μεγαλύτερη από 10%). Αντίθετα, υπερβολικά υψηλή περιεκτικότητα σε νερό μειώνει τον κορεσμό του σακχάρου και άρα την ταχύτητα κρυστάλλωσης, ενώ ανασταλτικά για την κρυστάλλωση λειτουργούν και οι φρουκτόζη και μαλτόζη, αφού αυξάνουν τη διαλυτότητα της γλυκόζης, καθώς και οι διεργασίες καθίζησης, φιλτραρίσματος ή φυγοκέντρωσης (Machado De-Melo et al., 2018).

1.4.5. Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Ηλεκτρική αγωγιμότητα ονομάζεται η ικανότητα ενός υλικού να διαπερνάται από ηλεκτρικό ρεύμα. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα του μελιού σχετίζεται με τη βοτανική του προέλευση, καθώς και με το περιεχόμενο του σε μεταλλικά στοιχεία, ανόργανα ιόντα αλλά και σε οργανικά οξέα και πρωτεΐνες, μεταξύ άλλων (Machado De-Melo et al., 2018). Σύμφωνα με τον ισχύοντα ευρωπαϊκό κανονισμό η ηλεκτρική αγωγιμότητα του μελιού ανθέων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 0,8 mS/cm, ενώ η ηλεκτρική αγωγιμότητα του μελιού μελιτώματος και καστανιάς πρέπει να είναι υψηλότερη από 0,8 mS/cm (Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2001).

1.4.6. Ιξώδες

Το μέλι είναι γενικά ένα υγρό με υψηλό ιξώδες η τιμή του οποίου ποικίλλει ανάλογα με την σύσταση και ιδιαίτερα με την περιεκτικότητά του μελιού σε νερό (Olaitan et al., 2007). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το ιξώδες είναι η βοτανική προέλευση του μελιού, η θερμοκρασία και η αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης. Υψηλότερη θερμοκρασία και περιεκτικότητα σε νερό και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες συνεπάγεται χαμηλότερο ιξώδες για το μέλι, ενώ συστατικά όπως οι δεξτρίνες και οι πρωτεΐνες αυξάνουν το ιξώδες (Machado De-Melo et al., 2018).

Το ιξώδες επηρεάζει το χειρισμό, την επεξεργασία, την αποθήκευση και την αισθητική ποιότητα του μελιού και, μαζί με την επιφανειακή τάση, είναι υπεύθυνο για τα χαρακτηριστικά αφρισμού του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018).

1.5. Τα είδη μελιού

Το μέλι διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στο μέλι ανθέων (ή νέκταρος) που παράγεται από το νέκταρ των φυτών και στο μέλι μελιτωμάτων, που παράγεται από εκκρίματα των φυτών ή των εντόμων που απομυζούν τα φυτά (Manyi-Loh et al., 2011). Το μέλι μελιτωμάτων παράγεται από μια ποικιλία αφιδών και εντόμων σε αρκετά φυτά, κυρίως δέντρα, με κυριότερα τα κωνοφόρα έλατο, πεύκο και ερυθρελάτη (Oddo et al., 2004a).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το pH, η οξύτητα, η περιεκτικότητα σε προλίνη, το χρώμα, αλλά και η πτητική σύνθεση και το αντιοξειδωτικό δυναμικό

διαφέρουν μεταξύ των μελιών ανθέων και μελιτωμάτων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό τους (Manji-Loh et al., 2011).

Στην Ευρώπη υπάρχουν περισσότερα από 100 βοτανικά είδη που είναι γνωστό ότι παράγουν μονοανθικό μέλι (Oddo et al., 2004b). Μονοανθικό (unifloral) μπορεί να χαρακτηριστεί το μέλι ανθέων εάν το ποσοστό γύρης που περιέχει προερχόμενο από ένα φυτό ξεπερνά το 45%, χωρίς να υπολογίζονται οι γυρεόκοκκοι από ανεμόφιλα και χωρίς νέκταρ φυτά. Ωστόσο, επειδή το ποσοστό γύρης που περιέχεται στο νέκταρ ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των βοτανικών πηγών, για μονοανθικές βοτανικές πηγές με μεγάλο αριθμό γυρεόκοκκων το ποσοστό γύρης της κύριας φυτικής πηγής κυμαίνεται από 60 έως περισσότερο από 90%, ενώ για μονοανθικές βοτανικές πηγές με μικρό αριθμό γυρεόκοκκων το ποσοστό γύρης της κύριας φυτικής πηγής κυμαίνεται από λιγότερο από 5 έως και 30%. Για τα μέλια μελιτώματος έχει προταθεί ότι ο λόγος στοιχεία μελιτώματος / σύνολο γυρεοκόκκων (HDE/P) πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 3 (Tsigouri et al., 2004).

Για την επαλήθευση της βοτανικής ταυτότητας ενός δείγματος μελιού θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του που θα πρέπει να συνάδουν, αντίστοιχα, με τις προτιμήσεις των καταναλωτών και τα αποδεκτά όρια των παραμέτρων για τον κάθε τύπο μελιού, καθώς επίσης και η μελισσοπαλυνολογική μελέτη η οποία θα πρέπει να συμφωνεί με την βοτανική πηγή που έχει δηλωθεί για το δείγμα μελιού (Oddo et al., 2004b). Η μελισσοπαλυνολογία αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό των ποσοστών γύρης και άρα των διαφόρων φυτικών πηγών που χρησιμοποίησαν οι μέλισσες για την παραγωγή ενός ορισμένου δείγματος μελιού (Gül & Pehlivan, 2018).

1.5.1. Μέλι θυμαριού

Το θυμαρίσιο μέλι στην Ελλάδα αποτελεί περίπου το 10% της συνολικής παραγωγής και παράγεται στα νότια και κεντρικά τμήματα της χώρας. Η σύνθεση του ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή αλλά προέρχεται κατά βάση από ένα μείγμα φυτών *T. capitatus*, *Satureja thymbra*, *Origanum vulgare* και, σε μικρότερο βαθμό, *Thymus serpyllum*. Το θυμάρι θεωρείται βοτανική πηγή με μικρό αριθμό γυρεόκοκκων και, σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, το θυμαρίσιο μέλι θα πρέπει να διαθέτει κατ'ελάχιστο ποσοστό 18% σε γυρεόκοκκους θυμαριού (Eleftheriou et al., 2009).

Το μέλι διαθέτει χαρακτηριστικό ανοιχτό χρώμα και γενικά ευχάριστη γεύση και άρωμα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.5.2. Μέλι πορτοκαλιάς

Η πορτοκαλιά αποτελεί σημαντικό εσπεριδοειδές της Μεσογείου. Το μέλι πορτοκαλιάς έχει χαρακτηριστικό, έντονο άρωμα εσπεριδοειδών, απαλή γεύση και ανοιχτόχρωμο κεχριμπαρέ χρώμα (Karabagias et al., 2017). Αντιπροσωπεύει περίπου το 10% της ετήσιας παραγωγής στην Ελλάδα (Karabagias et al., 2017) και στην ελληνική αγορά συχνά διατίθεται σε μείγμα με άλλα ανθόμελα (Thrasynoulou & Manikis, 1995).

1.5.3. Μέλι βαμβακιού

Το μέλι βαμβακιού συνιστά περίπου το 20% της ετήσιας παραγωγής στην Ελλάδα (Alissandrakis et al., 2005). Έχει ανοιχτό χρώμα και χαρακτηριστική βουτυρώδη γεύση, ενώ όταν κρυσταλλώσει γίνεται γαλακτόχρωμο (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.5.4. Μέλι ερείκης

Το μέλι Ερείκης στην Ελλάδα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις τύπους ανάλογα με το φυτό της οικογένειας των Ερεικωδών από το οποίο παράγεται: φθινοπωρινή ερείκη ή «σουσουρά» (*Erica verticillata*), ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και Ροδόδεντρο (*Rhododendron*). Το φθινοπωρινό μέλι ερείκης διαθέτει κοκκινωπό χρώμα, χαρακτηριστική οσμή και γεύση και σχετικά υψηλές τιμές υγρασίας, ενώ το ανοιξιιάτικο μέλι είναι πιο ανοιχτόχρωμο και έχει διαφορετική γεύση (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.5.5. Μέλι γλυκάνισου

Ο Γλυκάνισος (*Pimpinella anisum*) είναι αρωματικό φυτό της οικογένειας Umbelliferae, ενδημικό στη Μεσόγειο και τη Δυτική Ασία. Φέρει λευκά άνθη και μικρούς κιτρινοπράσινους σπόρους (Shojaii & Abdollahi Fard, 2012). Σύμφωνα με Έλληνες παραγωγούς, το μέλι Γλυκάνισου είναι μια σπάνια ποικιλία που συλλέγεται από ορισμένες μόνο περιοχές στην Ελλάδα. Διαθέτει ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μια «φαρμακευτική» χροιά στη γεύση (Παναγοπούλου, 2018)

1.5.6. Μέλι καστανιάς

Το μέλι καστανιάς (*Castanea sativa*) παράγεται από το νέκταρ του φυτού και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της αφίδας *Myzocallis castanicola* και σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσεται, κατ'εξαίρεση, ως ανθόμελο με χαρακτηριστικά μελιτώματος. Το χρώμα του ποικίλλει από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο και διαθέτει ιδιαίτερα χαρακτηριστική, έντονη, πικρή γεύση και δυνατό άρωμα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.5.7. Μέλι πεύκου

Το πευκόμελο αντιπροσωπεύει περίπου το 60% της συνολικής ετήσιας παραγωγής μελιού στην Ελλάδα και παράγεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica*, γνωστού ως «βαμβακάδα» ή «εργάτης» του πεύκου. Το πευκόμελο διαθέτει χαμηλά επίπεδα γλυκόζης οπότε κρυσταλλώνει με ιδιαίτερα βραδύ ρυθμό, ενώ το ανοιξιόχρωμο και το φθινοπωρινό πευκόμελο εμφανίζουν διαφορές, με το πρώτο να είναι πιο ανοιχτόχρωμο και διαυγές και με ιδιαίτερο άρωμα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.5.8. Μέλι ελάτης

Το μέλι ελάτης συνιστά περίπου το 5% της ετήσιας ελληνικής παραγωγής μελιού και παράγεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις κοκκοειδών και αφίδων που παρασιτούν στα ελληνικά είδη ελάτης. Στην Ελλάδα απαντάται η ελάτη η κεφαλληνιακή (*Abies cephalonica*) σε ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου, η ευρωπαϊκή ελάτη (*A. alba* ή *A. pectinata*) σε μεμονωμένα σημεία βορείως της οροσειράς του Ολύμπου και η υβριδογενής ελάτη (*A. hydrida* ή *A. borisii*) στην οροσειρά της Πίνδου.

Το μέλι ελάτης εμφανίζει ιδιαίτερα καλή γεύση και χαρακτηριστική εμφάνιση και χρώμα που ποικίλλουν ανάλογα με την περιοχή προέλευσής του. Διαθέτει υψηλό pH και χαμηλά επίπεδα γλυκόζης και ως εκ τούτου δεν κρυσταλλώνει γρήγορα (Θρασυβούλου et al., 2002).

1.6. Το μέλι Manuka

Το μέλι Manuka είναι ένα σκούρο, μονοανθικό μέλι που παράγεται από το νέκταρ των ανθέων του δέντρου Manuka (*Leptospermum scoparium*) της οικογένειας Myrtaceae, γηγενές στη Νέα Ζηλανδία και την ανατολική Αυστραλία.



Εικόνα 1.6.1: Άνθη *Leptospermum scoparium*

Το μέλι αυτό έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τον καθαρισμό

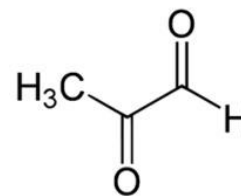
μολύνσεων, πληγών και εγκαυμάτων και τις τελευταίες δεκαετίες έχει μελετηθεί επισταμένα από την επιστημονική κοινότητα για τις βιολογικές του ιδιότητες και τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του δράσεις (Alvarez-Suarez et al., 2014).

Κάθε παρτίδα μελιού Manuka αναλύεται για την αντιβακτηριακή της δράση, η οποία ποικίλλει μεταξύ των μελιών Manuka και εκφράζεται ως ο «μοναδικός παράγοντας Manuka» (unique manuka Factor, UMF). Ο UMF αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός διαλύματος φαινόλης που αποδίδει παρόμοια ζώνη αναστολής ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* με το υπό δοκιμή μέλι (Machado De-Melo et al., 2018).

Όλα τα μέλια, συμπεριλαμβανομένου του Manuka, εμφανίζουν χαμηλές τιμές pH, υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα οποία οφείλονται, σε μεγάλο βαθμό, οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Ωστόσο, ειδικά το μέλι Manuka διατηρεί την αντιμικροβιακή του δράση ακόμα και όταν αραιωθεί σε μεγάλο βαθμό ή αδρανοποιηθεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου που περιέχει. Το 2008 ανακαλύφθηκε ότι η αιτία της δραστηριότητάς του αυτής, η οποία ονομάστηκε «μη-υπεροξειδιακή», οφείλεται στην μεθυλγλουξάλη (Carter et al., 2016).

Οι υδατάνθρακες που περιέχονται σε τρόφιμα και ποτά μπορούν κατόπιν επεξεργασίας, μαγειρέματος και παρατεταμένης αποθήκευσης να σχηματίσουν 1,2-δικαρβονυλικές ενώσεις, όπως η μεθυλογλουξάλη και η γλουξάλη, οι οποίες παράγονται μη ενζυμικά μέσω αντιδράσεων καραμελοποίησης ή αντιδράσεων Maillard (Adams et al., 2008).

Η μεθυλγλυοξάλη (MGO) προκύπτει από την άμεση αφυδάτωση της διυδροξυακετόνης (DHA) η οποία βρίσκεται φυσικά στο νέκταρ των ανθέων του είδους *Leptospermum scoparium* και άλλων συγγενικών ειδών *Leptospermum*, αν και τα επίπεδα της μεθυλγλυοξάλης μπορεί να κυμαίνονται από 100 έως και περισσότερο από 1200ppm σε μέλια απ' το είδος *Leptospermum* (Carter et al., 2016). Η μεθυλγλυοξάλη έχει επίσης βρεθεί και σε μέλια από διαφορετικές βοτανικές πηγές, αλλά σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ό,τι στα μέλια Manuka (Machado De-Melo et al., 2018). Επίπεδα μεθυλγλυοξάλης και άλλων 1,2 δικαρβονυλικών ενώσεων έχουν εντοπιστεί και σε άλλα τρόφιμα και ποτά, όπως στο κρασί, τη μύρα και τα γαλακτομικά προϊόντα, μεταξύ άλλων (Adams et al., 2008). Η MGO μπορεί να αντιδρά μη ειδικά με μακρομόρια όπως το DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες και, αν και θεωρητικά μπορεί να είναι τοξική για τα κύτταρα των θηλαστικών, δεν παρατηρούνται ενδείξεις βλάβης στα κύτταρα του ξενιστή μετά από επαφή με το μέλι Manuka (Carter et al., 2016).



Εικόνα 1.6.2: Χημική δομή της μεθυλγλυοξάλης

Παρόλο που, γενικά, όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα της MGO ή του υπεροξειδίου του υδρογόνου τόσο πιο δραστικό είναι και το μέλι, ο συσχετισμός αυτός δεν ισχύει πάντα, γεγονός που υποδηλώνει ότι και άλλα συστατικά του μελιού ευθύνονται για τις δράσεις που εμφανίζει (Carter et al., 2016). Αυτά περιλαμβάνουν την royalisin (bee defensin-1), ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένα της μέλισσας (Machado De-Melo et al., 2018) και την λεπτοσίνη (ή λεπτοσπορίνη (Johnston et al., 2018)), ένα γλυκοσίδιο που βρίσκεται αποκλειστικά στο μέλι Manuka και φαίνεται να ρυθμίζει την αντιμικροβιακή του δράση (Carter et al., 2016). Η μεθυλγλυοξάλη και η royalisin (bee defensin-1), έχουν αναφερθεί ως οι κύριες ενώσεις υπεύθυνες για την μη-υπεροξειδιακή δράση του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018). Επιπλέον, το μέλι Manuka διαθέτει ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε διάφορες φαινολικές ενώσεις (Alvarez-Suarez et al., 2014) που δρουν συνεργαστικά μεταξύ τους ή με άλλα συστατικά και ευθύνονται για την αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη του δράση (Carter et al., 2016). Τα κυριότερα φλαβονοειδή που έχουν βρεθεί στο μέλι Manuka είναι η πινομπασκίνη, η πινοσεμπρίνη και η χρυσίνη (Alvarez-Suarez et al., 2014).

Το μέλι Manuka έχει δείξει προστατευτική δράση έναντι ενός μεγάλου εύρους παθογόνων μικροοργανισμών και το 2007 εγκρίθηκε από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Φαρμάκων των Η.Π.Α. ως προτεινόμενη εναλλακτική θεραπεία για την ανακούφιση πληγών (Johnston et al., 2018).

Διαφορετικοί τύποι μελιού Manuka εμφανίζουν διαφορετικές αντιβακτηριακές επιδράσεις, ενώ τα Gram-αρνητικά βακτήρια φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά από τα Gram-θετικά βακτήρια (Johnston et al., 2018). Το μέλι Manuka φαίνεται ότι μπορεί να μεταβάλει το σχήμα και το μέγεθος των βακτηρίων και δύο μελέτες έδειξαν ότι προκάλεσε απορρύθμιση της ανάπτυξης και επηρέασε την κυτταρική διαίρεση σε βακτηριακά είδη *B. subtilis* και *S. aureus* (Johnston et al., 2018). Έχει επίσης βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αντιβιοτικά έναντι ανθεκτικών βακτηριακών λοιμώξεων και να αναστρέψει την ανθεκτικότητα των βακτηρίων (Johnston et al., 2018).

Το Manuka διαταράσσει επίσης τα κυτταρικά συσσωματώματα και εμποδίζει τον σχηματισμό βιοφίλμ που περιλαμβάνουν είδη του γένους *Streptococcus* και *Staphylococcus* καθώς και τα είδη *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* και *Enterobacter cloacae* μεταξύ άλλων. Κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, υπεύθυνη για την αναστολή των βιοφίλμ φαίνεται να είναι η MGO (Carter et al., 2016) αλλά και τα σάκχαρα που περιέχονται στο μέλι (Johnston et al., 2018).

Το μέλι Manuka έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει ανασταλτικές επιδράσεις έναντι του ιού varicella-zoster, υπευθύνου για την ανεμοβλογιά και τον έρπητα ζωστήρα, καθώς και του ιού της γρίπης, αλλά δεν εμφανίζει ιδιαίτερη ευαισθησία έναντι μυκητιακών δερματικών παθογόνων (Carter et al., 2016). Στην αντιμικροβιακή δράση του αλλά και την επούλωση των ιστών συμβάλλει και η δυνατότητα του να διεγείρει τα μακροφάγα ώστε να απελευθερώσουν κυτοκίνες TNF-α, IL-1 β και IL-6 (Johnston et al., 2018).

Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο μέλι Manuka, εμφανίζει επιπλέον αντιοξειδωτική δράση μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, ενώ έχει βρεθεί ότι μειώνει σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού με χρονο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης φαίνεται ότι περιλαμβάνει την διεγερση αποπτωτικών οδών μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 9, του PARP, του κατακερματισμού του DNA και μέσω της απενεργοποίησης της Bcl-2 πρωτεΐνης (Alvarez-Suarez et al., 2014).

Το μέλι Manuka εμφανίζεται γενικά ασφαλές σε υγιή άτομα, καθώς σύμφωνα με μελέτη δεν προκάλεσε αλλεργίες ή αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου (Alvarez-Suarez et al., 2014) και, παράλληλα, δεν φαίνεται να υπάρχει δημοσιευμένη αναφορά για βακτηριακή αντοχή έναντι του μελιού, λόγω της πολυπλοκότητας και των αλληλεπιδράσεων των συστατικών του (Johnston et al., 2018).

Ωστόσο, έρευνες έχουν εντοπίσει την ισχυρή αντιβακτηριακή δράση και άλλων μελιών, η οποία εμφανίστηκε παρόμοια ή και ανώτερη του μελιού Manuka, οπότε είναι σημαντικό επόμενες μελέτες να εστιάσουν σε μέλια από διάφορες περιοχές του κόσμου που πιθανώς να εμφανίζουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα έναντι του Manuka (Anthimidou & Mossialos, 2013).

1.7. Ιικό στέλεχος Coxsackie B5

Ο Coxsackie B5 είναι ένας από τους 6 οροτύπους(B1-B6) των ιών της ομάδας Coxsackie B του γένους των Εντεροϊών που ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae*.

Οι εντεροϊοί ονομαστήκαν και κατηγοριοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1957. Η πολιομυελίτιδα υπήρξε η πρώτη και σημαντικότερη ασθένεια που αναγνωρίστηκε ότι προκαλείται από εντεροϊό. Παρόλο που η ασθένεια καταγράφεται εδώ και τουλάχιστον 3.500 χρόνια, η πρώτη της ιατρική περιγραφή δημοσιεύτηκε το 1789 και η μεταδοτική της φύση περιγράφηκε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Ο υπεύθυνος εντεροϊός ιός τελικά απομονώθηκε για πρώτη φορά σε πιθήκους το 1908 (Cherry et al., 2011).

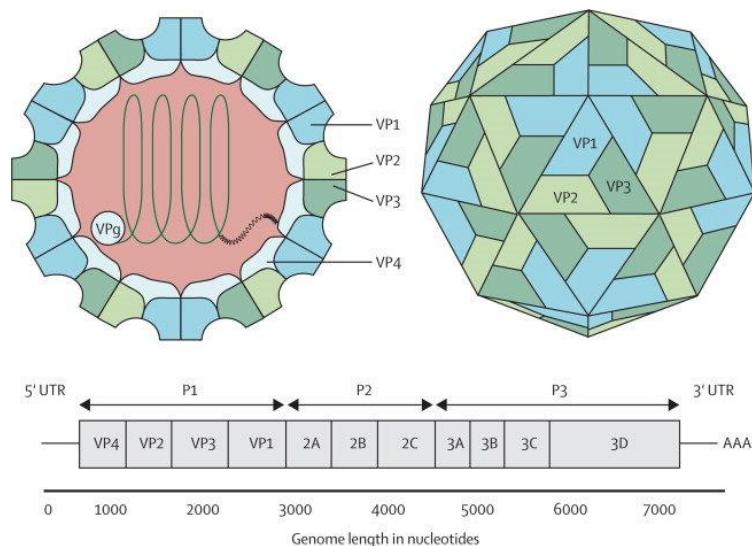
Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί σήμερα κατηγοριοποιούνται σε 4 είδη (A-D) τα οποία αποτελούνται από διακριτούς οροτύπους ιών, με βάση αντιγονικές και γενετικές ομοιότητες. Δομικά ιικά γονίδια, όπως το 1D που κωδικοποιεί για την VP1 πρωτεΐνη, χρησιμοποιούνται με βάση την φυλογένεση για την περαιτέρω διαίρεση των κυκλοφορούντων στελεχών του κάθε οροτύπου σε γενετικές ομάδες (Henquell et al., 2013).

Εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό παγκοσμίως και η κυκλοφορία τους αυξάνεται το χρονικό διάστημα από το καλοκαίρι μέχρι και τις αρχές του φθινοπώρου σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές κλινικές επιπλοκές ειδικά σε νεογέννητα και μικρά παιδιά και, ενδεικτικά,

αποτελούν την βασική αιτία της οξείας μηνιγγίτιδας, της νόσου χεριών, ποδιών και στόματος και των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού (Henquell et al., 2013).

Ο ιός Coxsackie απομονώθηκε αρχικά το 1948, ενώ η οφειλόμενη στον ιό αυτό επιδημική πλευροδυνία περιγράφηκε για πρώτη φορά 200 χρόνια νωρίτερα, το 1735 (Cherry et al., 2011). Οι ιοί Coxsackie διαιρούνται σήμερα στις ομάδες A και B που αποτελούνται, αντίστοιχα, από 23 (1 ως 22 και 24) και 6 (1 ως 6) οροτύπους (Hu et al., 2012). Οι ιοί της ομάδας B ανήκουν στο είδος των Εντεροϊών B (Henquell et al., 2013).

Ο Coxsackie B5 (CVB5) αποτελεί, μεταξύ των ιών της ομάδας B, έναν από τους επικρατέστερους οροτύπους που προσβάλλουν τους ανθρώπους (Hu et al., 2012). Ο Coxsackie B5, όπως και όλοι οι εντεροϊοί, είναι ιός χωρίς λιπιδικό περίβλημα που αποτελείται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διαμέτρου περίπου 30 nm και φέρει ως γονιδίωμα ένα γραμμικό, μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA μόριο με μέγεθος περίπου 7-8 kb. Οι τέσσερις καψιδιακές πρωτεΐνες (VP1-VP4), που συγκροτούν το ισωμάτιο κωδικοποιούνται στην P1 περιοχή του γονιδιώματος, ενώ οι υπόλοιπες επτά, μη δομικές και απαραίτητες για την ιική αντιγραφή, πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στις P2 και P3 περιοχές. Στο 5' άκρο του γονιδιώματος βρίσκεται συνδεδεμένη



Εικόνα 1.7.1: Δομή και γονιδίωμα Εντεροϊού

και η πρωτεΐνη VPg η οποία λειτουργεί ως εκκινήτης για τη σύνθεση RNA. Περίπου 60 αντίγραφα καθεμιάς από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες συγκροτούν το καψίδιο του ιού με την VP4 πρωτεΐνη να επενδύει το εσωτερικό του και τις VP1, VP2 και VP3 να βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια. (Sin et al., 2015; Gullberg et al., 2010).

Ο Coxsackie B5 διαθέτει επίσης αρκετά στοιχεία CRE (Cis-acting RNA elements) που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του, ενώ περιέχει και μια εσωτερική θέση δέσμησης του ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) στην 5' αμετάφραστη περιοχή με την οποία αλληλεπιδρούν τα ριβοσώματα του ξενιστή για την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γονιδιώματος. Το προϊόν της μετάφρασης είναι μια μακρά πολυπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια διασπάται από ιικές πρωτεάσες για να προκύψουν οι ώριμες δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μετά την παραγωγή των πρωτεϊνών ξεκινά η αντιγραφή και σύνθεση θετικής και αρνητικής πολικότητας ιικών RNA, με τον ιό να μεταβάλλει τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή ευνοώντας την αντιγραφή του. Έχει επίσης δειχθεί ότι διάφοροι εντεροϊοί, συμπεριλαμβανομένου του Coxsackie B, αναστέλλουν επιλεκτικά την διαδικασία της αυτοφαγίας στον ξενιστή και χρησιμοποιούν τις αυτοφαγικές μεμβράνες του κυττάρου για προωθήσουν την δική τους αντιγραφή και να παρακάμψουν την άμυνα του κυττάρου (Sin et al., 2015).

Ο βασικός κυτταρικός υποδοχέας που χρησιμοποιούν για την είσοδό τους και οι έξι ορότυποι του ιού Coxsackie B είναι ο υποδοχέας CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor), μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Gullberg et al., 2010). Όπως υποδηλώνει το όνομα, αυτός ο διαμεμβρανικός υποδοχέας χρησιμοποιείται τόσο από τους αδενοϊούς όσο και από τους ιούς Coxsackie, αλλά ο τροπισμός των δύο αυτών ιών διαφέρει *in vivo*. Ο υποδοχέας CAR εντοπίζεται στους στενοσυνδέσμους των πολωμένων κυττάρων (Sin et al., 2015) και, πιο συγκεκριμένα στην ανθρώπινη καρδιά, στους εμβόλιμους δίσκους (Marin-Garcia, 2007). Από ορισμένα ιικά στελέχη χρησιμοποιείται επιπλέον ως συνυποδοχέας ο DAF (Decay Accelerating Factor) (Sin et al., 2015), πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση του καταρράκτη του συμπληρώματος (Gullberg et al., 2010) και εκφράζεται ευρέως σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Marin-Garcia, 2007). Παρόλο που η αλληλεπίδραση του ιού μόνο με την πρωτεΐνη DAF δεν αρκεί για τη μόλυνση των κυττάρων (Gullberg et al., 2010), από κοινού σύνδεση του ιού στους υποδοχείς DAF και CAR ενισχύει την ενσωμάτωσή του (Marin-Garcia, 2007). Ο ιός συνδέεται στην πρωτεΐνη DAF στην κορυφαία επιφάνεια των πολωμένων κυττάρων και στην συνέχεια μετακινείται κατά μήκος της μεμβράνης στους στενοσυνδέσμους, όπου συνδέεται με τον υποδοχέα CAR και εισέρχεται στο κύτταρο (Sin et al., 2015).

Ο Coxsackie B5 αποτελεί έναν από τους 5 συχνότερα εμφανιζόμενους εντεροϊούς σε χώρες όπως η Αμερική και η Γαλλία (Henquell et al., 2013). Ο ιός εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα, και η μόλυνση επιτυγχάνεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού (Sin et al., 2015).

Οι μολύνσεις από τους ιούς Coxsackie B γενικά προσβάλλουν κυρίως τα παιδιά (Valestra et al., 2016) και είναι συχνά ασυμπτωματικές, αλλά μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές νευρολογικές και καρδιακές παθήσεις (Gullberg et al., 2010). Γενικά, ο Coxsackie B5 εμφανίζεται περισσότερο νευροτροπικός παρά καρδιοτροπικός, σε αντίθεση με άλλους οροτύπους της ομάδας B (Cherry et al., 2011). Η τυπική κλινική εκδήλωση του CVB5 σχετίζεται με την οξεία μηνιγγίτιδα, αλλά ευθύνεται και για την ασθένεια ποδιών, χεριών και στόματος (Henquell et al., 2013) και αποτελεί συχνή αιτία εμφάνισης μυοκαρδίτιδας και διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας (dilated cardiomyopathy, DCM) (Hu et al., 2012).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η εξέταση δειγμάτων μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και διαφορετικές βοτανικές πηγές ως προς την αντι-ική τους δράση έναντι του εντεροϊού Coxsackie B5 και, παράλληλα, ως προς την τοξικότητα τους έναντι κυτταρικής σειράς ραβδομυοσάρκωματος (Rd). Η δραστηριότητα των οκτώ (8) υπό εξέταση δειγμάτων ελληνικού μελιού συγκρίθηκε με την αντίστοιχη δραστηριότητα δείγματος μονοανθικού μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί επισταμένα για τις αντιμικροβιακές του δράσεις και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών, αλλά και δείγματος συνθετικού μελιού, ενός εργαστηριακά παρασκευασμένου μείγματος σακχάρων.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Δείγματα μελιού

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά οκτώ (8) δείγματα μελιού προερχόμενα από διαφορετικές βοτανικές πηγές και διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα μελιού, η γεωγραφική περιοχή και βοτανική πηγή

προέλευσης και η ημερομηνία συγκομιδής παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.1. Τα δείγματα των μελιών φυλάχθηκαν σε σκιερό και δροσερό μέρος.

A/A	ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΗΓΗ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ
1	Γλυκάνισος	Βόρεια Εύβοια	2018
2	Έλατο	Όρος Γκιώνα, Φωκίδα	2018
3	Έλατο & Θυμαρί	Όρος Γκιώνα, Φωκίδα	2018
4	Θυμαρί	Γαλαξίδι	2018
5	Καστανιά	Άγιο Όρος, Χερσόνησος του Άθω	Ιούλιος 2018
6	Κουμαριά	Άγιο Όρος, Χερσόνησος του Άθω	Νοέμβριος 2018
7	Πολυανθικό	Όρος Όλυμπος	Ιούνιος 2016
8	Πολυανθικό	Άζωρος Ελασσόνας	2018

Πίνακας 3.1.1.: Βοτανική πηγή, γεωγραφική προέλευση και ημερομηνία συγκομιδής δειγμάτων μελιού

3.1.1. Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka είναι της εταιρείας Steens™ και προέρχεται από το Βόρειο Νησί της Νέας Ζηλανδίας. Διαθέτει UMF24+ που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα σε μεθυλγλυοξάλη τουλάχιστον 1122 mg/kg, από τις υψηλότερες τιμές που είναι διαθέσιμες στην αγορά. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα αυτού του μελιού έχει διαπιστωθεί σε πλήθος μελετών, οπότε η αντι-ικκή δράση των δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν συγκρίθηκε με αυτή του Manuka.

3.1.2. Συνθετικό Μέλι

Το συνθετικό μέλι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control μελιού.

Παρασκευάστηκε με διάλυση 3 g σακχαρόζης, 15 g μαλτόζης, 80,1 g φρουκτόζης και 67 g γλυκόζης (προμηθευμένα από τη Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα) σε 34 ml απιονισμένου νερού. Το μείγμα αυτό θερμάνθηκε στους 56 °C σε υδατόλουτρο για να επιταχυνθεί η διάλυση. Αυτό το διάλυμα αντιπροσωπεύει τα τέσσερα κυρίαρχα σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι (Anthimidou & Mossialos, 2013).

3.2. Πειραματικό στέλεχος

Για το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ιικό στέλεχος Coxsackie B5 (AF114383) που προέρχεται από την American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, U.S.A.). Το στέλεχος CVB5 ανήκει στην ομάδα των Εντεροϊών Β (EV-B), μια ομάδα ιών με θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA γενετικό υλικό.

3.3. Κυτταροκαλλιέργειες

Για την καλλιέργεια και την απομόνωση των ιών χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος (Rhabdomyosarcoma-Rd, CCL-136™, ATTC), με τον χειρισμό των στελεχών να πραγματοποιείται υπό άσηπτες συνθήκες, σε συσκευές καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφαλείας 2 και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα υλικά.

Η κυτταρική σειρά επωαζόταν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών 25cc στους 37°C και παρουσία 5% CO₂, θρεπτικού υλικού D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 1X Antibiotic-Antimycotic (Biosera) και 10% βόειου ορού.

Τα κύτταρα εξετάζονταν καθημερινά στο ανάστροφο μικροσκόπιο διέλευσης φωτός, για να παρατηρηθεί η ποιότητά τους και η κάλυψη της επιφάνειας της πλαστικής φιάλης κυτταροκαλλιιεργειών και όταν τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 90% της επιφάνειας της φιάλης, ακολουθούσε ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων. Κατά τον αναδιπλασιασμό αρχικά αποβαλλόταν το θρεπτικό μέσο και έπειτα πραγματοποιούνταν δυο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα θρυψίνης – EDTA με επώαση για 2 λεπτά στους 37°C για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης. Τα αποκολλημένα κύτταρα επαναδιαλύονταν έπειτα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Growth medium, GM) με παράλληλη ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας έτσι ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιραζόταν, τέλος, ισόποσα σε τρεις νέες πλαστικές φιάλες και τοποθετούνταν στους 37°C μέχρι τον επόμενο αναδιπλασιασμό.

Κατά την μόλυνση των κυττάρων με τα ιικά στελέχη, το μέσο ανάπτυξης αποβαλλόταν και αντικαθιστούνταν από μέσο διατήρησης (Maintenance medium,

MM) με 2% περιεκτικότητα σε ορό, επιτυγχάνοντας μια αργή κυτταρική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια του ιικού πολλαπλασιασμού.

3.4. Καλλιέργεια ιών και μέτρηση ιικού τίτλου

Ο τίτλος του ιού για το στέλεχος CVB5 υπολογίστηκε με βάση την τιμή CCID₅₀, που αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (96 well plate), σε κάθε θέση της οποίας προστέθηκαν 100μl κυττάρων Rd και ακολούθησε επώαση για 24h στους 37°C ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στον πάτο της πλάκας μέχρι να υπάρχει ικανοποιητική της κάλυψη. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 100μl σε κάθε πηγαδάκι από τις σειριακές αραιώσεις του ιού (10⁻¹ έως 10⁻⁸). Η πλάκα τοποθετήθηκε εκ νέου για επώαση στους 37°C και παρακολουθούνταν σε καθημερινή βάση στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, μέχρι την εμφάνιση αλλοιώσεων στον αρνητικό μάρτυρα (cell control, c.c.).

Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

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

CCID: Cell Culture Infective Dose (μολυσματική δόση κυτταροκαλλιέργειας)

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

Με τον τύπο αυτό υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος της αρχικής φλάσκας. Μετά τον υπολογισμό πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις μέχρι τελικής συγκέντρωσης 10² CCID₅₀ / 0,1 ml. Ο συγκεκριμένος ιικός τίτλος επιλέχθηκε καθώς, με βάση προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας, βρέθηκε ότι προκαλεί συνολική καταστροφή των κυττάρων Rd μετά το πέρας 48 ωρών από τη χρονική στιγμή του ενοφθαλμισμού του σε κύτταρα χωρίς άλλη κατεργασία.

3.5. Προετοιμασία αραιώσεων δειγμάτων μελιού και έλεγχος τοξικότητας

Τα οκτώ δείγματα μελιού εξετάστηκαν, σε διάφορες συγκεντρώσεις, ως προς την τοξικότητα τους έναντι των κυττάρων Rd αλλά και ως προς την αντι-ικική τους δράση έναντι του ιού CVB5. Η τοξικότητα και η αντι-ικική δράση των 8 υπό εξέταση δειγμάτων συγκρίθηκε με αυτή του μελιού Manuka και του συνθετικού μελιού. Η τοξικότητα εκφράστηκε ως εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathogenic effect, CPE) στα κύτταρα Rd. Συγκεκριμένα, η καταστροφή του 25% περίπου των κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι σημειωνόταν ως τιμή CPE 1⁺, η καταστροφή του 50% περίπου των κυττάρων σημειωνόταν ως CPE 2⁺, η καταστροφή του 75% περίπου των κυττάρων ως CPE 3⁺ και η συνολική καταστροφή (100%) των κυττάρων σημειωνόταν ως CPE 4⁺. Σημειώνεται ότι το κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση εξεταζόταν εις τριπλούν (σε τρία πηγαδάκια) της εκάστοτε πλάκας μικροτιτλοποίησης.

3.5.1. Αρχικές προσεγγίσεις

Στο πρώτο σκέλος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις για τον έλεγχο της τοξικότητας των δειγμάτων μελιού στην κυτταροκαλλιέργεια, χωρίς την προσθήκη ιού:

- Δείγματα μελιού χωρίς επεξεργασία
- Φιλτράρισμα των δειγμάτων μελιού
- Επεξεργασία με καταλάση των δειγμάτων μελιού
- Επεξεργασία με καταλάση και φιλτράρισμα των δειγμάτων μελιού

Στο στάδιο αυτό, για τα δείγματα μελιού χωρίς επεξεργασία, αρχικά σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 πηγαδιών προστέθηκαν τα διάφορα δείγματα μελιού αραιωμένα σε θρεπτικό μέσο D-MEM σε συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v και ελεγχόταν καθημερινά η εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE).

Οι αραιώσεις των δειγμάτων μελιού ετοιμάστηκαν ως εξής: αρχικά ετοιμάστηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση 50% v/v τοποθετώντας ισάριθμο όγκο μελιού και θρεπτικού D-MEM σε σωλήνες erpendorf των 2ml. Μετά από σύντομη ανάδευση, ορισμένος όγκος από τη συγκέντρωση 50% v/v αφαιρούνταν και αναμειγνυόταν με

ισάριθμο όγκο θρεπτικού D-MEM για την δημιουργία της αμέσως μικρότερης συγκέντρωσης 25% v/v. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν με ανάμειξη ισάριθμων όγκων μείγματος μελιού από την προηγούμενη συγκέντρωση και νέου θρεπτικού D-MEM μέχρι να προκύψουν όλες οι επιθυμητές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές μοιράστηκαν στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Παράλληλα, κύτταρα σε θρεπτικό D-MEM χωρίς άλλη κατεργασία λειτούργησαν ως αρνητικό control (cell control, c.c.). Ο τελικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης ήταν 200μl.

Για την ετοιμασία της πλάκας με τα φιλτραρισμένα δείγματα μελιού, αφότου ετοιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v των δειγμάτων μελιού, επιπλέον τα δείγματα περάστηκαν με τη βοήθεια σύριγγας από φίλτρο διαμέτρου 45 μm (Millipore Corporation, U.S.A.).

Για την ετοιμασία της πλάκας με τα κατεργασμένα με καταλάση δείγματα μελιού, αφότου ετοιμάστηκαν οι διάφορες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού, επιπλέον προστέθηκε καταλάση (33.000 Units/ml, SERVA) σε τελική συγκέντρωση 600 U/ml σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 ώρα.

Για την ετοιμασία της πλάκας με τα φιλτραρισμένα και κατεργασμένα με καταλάση δείγματα μελιού, τα δείγματα περάστηκαν αρχικά από φίλτρο και έπειτα προστέθηκε καταλάση σε τελική συγκέντρωση 600 U/ml και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 ώρα.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτών των πλακών, οι συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v εγκαταλείφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν νέες, μικρότερες συγκεντρώσεις μελιού εκφρασμένες σε mg/ml. Επιπλέον, από τις τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκε η χρήση των δειγμάτων μελιού χωρίς καμία επεξεργασία ως η καταλληλότερη για τα επόμενα στάδια του πειράματος.

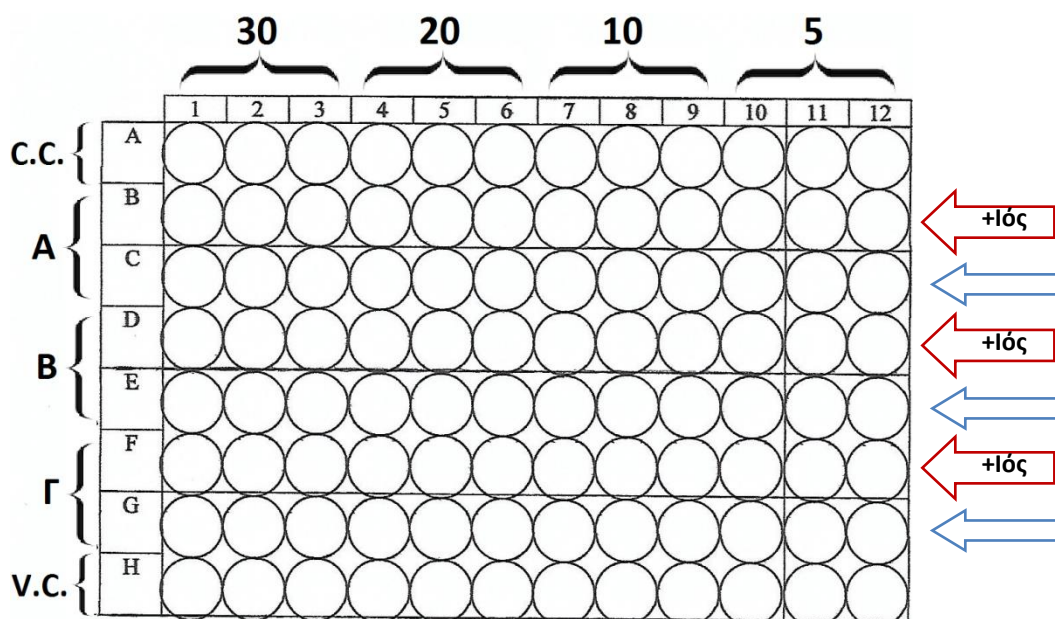
3.5.2. Έλεγχος τοξικότητας σε μικρότερες συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού

Δείγματα μελιού αραιωμένα σε θρεπτικό μέσο D-MEM σε συγκεντρώσεις 30, 20, 10 και 5 mg/ml προστέθηκαν σε συγκεκριμένα πηγαδάκια της εκάστοτε πλάκας μικροτιτλοποίησης, σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα της Εικόνας 3.5.2.1., και

ελεγχόταν καθημερινά η εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Το μέλι Manuka προστίθεντο σε όλες τις πλάκες μαζί με δύο ακόμα δείγματα μελιού κάθε φορά.

Σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης εξετάζονταν δύο δείγματα μελιών (σημειώνονται ως «Α» και «Β» στην Εικόνα 3.5.2.1) σε διάφορες συγκεντρώσεις και η κυτταροτοξικότητα τους (και η αντι-ική τους δράση) συγκρινόταν με το μέλι Manuka (σημειώνεται ως «Γ» στην εικόνα) που τοποθετούνταν σε κάθε πλάκα. Κάθε πλάκα περιελάμβανε και μια σειρά αρνητικού control (cell control, c.c.), δηλαδή κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο διατήρησης D-MEM, καθώς και μια σειρά θετικού control (virus control, v.c.) δηλαδή κύτταρα Rd ενοφθαλμισμένα με εναιώρημα ιού (αναλύεται παρακάτω). Ο τελικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι ήταν 200 μl ($V_{\text{τελ.}}=200\mu\text{l/well}$).

Για την επίτευξη των επιθυμητών τελικών συγκεντρώσεων του μελιού στα πηγαδάκια με τελικό όγκο 200μl παρασκευάζονταν αρχικά διπλάσιες συγκεντρώσεις μελιού (60, 40, 20 και 10 mg/ml). Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο στην πλάκα μικροτιτλοποίησης αφαιρούνταν και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαφόρων δειγμάτων μελιού προστίθονταν στα πηγαδάκια και ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl θρεπτικού D-MEM, σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα της Εικόνας 3.5.2.1. Έτσι, οι αρχικά παρασκευασμένες διπλάσιες συγκεντρώσεις υποδιπλασιάζονταν στις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις (30, 20, 10 και 5 mg/ml) στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης με $V_{\text{τελ.}}=200\mu\text{l/well}$.



Εικόνα 3.5.2.1: Ενδεικτική οργάνωση πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Τα γράμματα A, B και Γ στα αριστερά αντιστοιχούν στα διάφορα δείγματα μελιού. Οι συγκεντρώσεις στην κορυφή αναφέρονται στις αραιώσεις των δειγμάτων μελιού σε θρεπτικό D-MEM και εκφράζονται σε mg/ml. Οι σειρές (B, D, F) στις οποίες ενοφθαλμίστηκε ο ιός CVB5 για τον έλεγχο της αντι-ικικής δράσης του εκάστοτε δείγματος μελιού στις διάφορες αραιώσεις του σημειώνονται με κόκκινο βέλος. Οι σειρές (C, E, G) στις οποίες προστέθηκαν οι αραιώσεις των δειγμάτων μελιού σε θρεπτικό D-MEM για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας σημειώνονται με μπλε βέλος. Το κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση εξεταζόταν εις τριπλούν. Οι σειρές A και H αποτέλεσαν τον αρνητικό (c.c.) και θετικό (v.c.) μάρτυρα αντίστοιχα.

3.6. Ενοφθαλμισμός ιού σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία των δειγμάτων μελιού και μελέτη αντι-ικικής δράσης των δειγμάτων

Η μόλυνση της κυτταρικής σειράς Rd με τον ιό CVB5 πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση μίας ώρας (1h) του ιού παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των δειγμάτων μελιού, με σκοπό τη μελέτη της αντιικής δράσης του κάθε μελιού και τη σύγκριση της με αυτή του μελιού Manuka και του συνθετικού μελιού. Η μελέτη της αντι-ικικής δράσης έγινε παράλληλα με την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων.

Στο πειραματικό μέρος, αρχικά παρασκευάστηκαν διπλάσιες, σε σχέση με τις επιθυμητές, συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος μελιού (60, 40, 20 και 10 mg/ml), όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (Ενότητα 3.5.2). Στις συγκεντρώσεις

αυτές προστέθηκε ισόποσος όγκος εναιωρήματος 10^2 CCID₅₀ του ιικού στελέχους CVB5. Έτσι, οι αρχικά παρασκευασμένες διπλάσιες συγκεντρώσεις μελιών υποδιπλασιάζονταν στις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις (30, 20, 10 και 5 mg/ml) μετά την προσθήκη του ιικού εναιωρήματος. Τα μείγματα των διαφόρων αραιώσεων μελιού σε D-MEM και ιού επωάστηκαν έπειτα επί μία ώρα στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C.

Μετά το πέρας της επώασης, από 200μl των διαφόρων συγκεντρώσεων των δειγμάτων μελιού παρουσία ιού συγκέντρωσης 10^2 CCID₅₀/0,1ml ενοφθαλμίστηκαν σε κάθε θέση (εις τριπλούν) στις σειρές B, D και F (200μl/θέση) της πλάκας μικροτιτλοποίησης, σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα της Εικόνας 3.5.2.1. Η σειρά H αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα (virus control, v.c.) και σε αυτήν προστέθηκαν 100μl ιικού εναιωρήματος 10^2 CCID₅₀/0,1ml καθώς και 100μl θρεπτικού D-MEM ανά θέση. Στη σειρά A, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, δεν προστέθηκε ιικό δείγμα καθώς αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα (cell control, c.c.) που περιείχε μόνο κύτταρα σε 200μl θρεπτικού D-MEM. Επομένως, ο τελικός όγκος σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης ήταν $V_{\text{τελ.}}=200\mu\text{l}$.

Η πλάκα τοποθετήθηκε έπειτα για επώαση στους 37°C και η παρακολούθησή της για εμφάνιση αντι-ικικής αλλά και κυτταροπαθογόνου δράσης των δειγμάτων μελιού διήρκησε 2 μέρες, δηλαδή μέχρι τη συνολική καταστροφή των κυττάρων Rd του θετικού μάρτυρα (v.c.) από τον ιό. Ακολούθησε τοποθέτηση της πλάκας στους -20°C για μία μέρα και έπειτα συλλογή του υλικού της κυτταροκαλλιέργειας ανά τριπλέτα πηγαδιών. Τα δείγματα που είχαν τοποθετηθεί εις τριπλούν συλλέχθηκαν, δηλαδή, στον ίδιο σωλήνα.

3.7. Εκχύλιση του ιικού RNA

Για την εκχύλιση του RNA γενετικού υλικού του ιού, αλλά και του DNA των κυττάρων, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Casas και συνεργατών (Casas et al., 1995). Συγκεκριμένα, σε erpendorf των 2ml προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml), 300μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate) και 100μl δείγματος της κάθε τριπλέτας σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής. Ακολούθησε σύντομη ανάδευση (vortex) του δείγματος

και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολούθησε εκ νέου ανάδευση και επώαση στον πάγο για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της διάρκειας επώασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά (14.000rcf, 4°C) και έπειτα έγινε αποβολή του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος που απέμεινε σε 500μl αιθανόλης 70%. Ακολούθησε εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (14.000rcf, 4°C), μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο αποβλήθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου ύδατος (ddH₂O). Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύντομη ανάδευση του μείγματος και αποθήκευση στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

3.8. Αντίστροφη μεταγραφή

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) είναι απαραίτητη καθώς οι εντεροϊοί διαθέτουν ένα μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό. Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, με τη χρήση του RNA του ιού ως εκμαγείου συντίθεται τελικά ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο RNA:cDNA ώστε να ακολουθήσει η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR) για την ενίσχυση συγκεκριμένης περιοχής του ιικού γενώματος.

Για την αντίστροφη μεταγραφή στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μείγμα τυχαίων εκκινητών (επτανουκλεοτιδίων, N7) που υβριδίζονται σε πολλαπλές θέσεις στο ιικό γονιδίωμα παράγοντας ένα μείγμα μορίων cDNA που αντιστοιχούν στο μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματος του ιού.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την παρασκευή δύο μειγμάτων. Το πρώτο μείγμα περιέχει για την κάθε αντίδραση 100pmol τυχαίων εκκινητών, 4mM dNTPs και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 7μl. Σε σωλήνες erpendorf προστέθηκαν 7μl/erpendorf από το μείγμα αυτό και 5μl από το εκάστοτε δείγμα RNA από την εκχύλιση που προηγήθηκε.

Οι σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C για την αποφυγή σχηματισμού δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο.

Το δεύτερο μείγμα περιείχε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Fast Gene Buffer, 0,01 mM DTT, 100U ενζύμου Fast Gene Scriptase (Nippon Genetics) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 8μl για την κάθε αντίδραση. 8μl από το παραπάνω μείγμα προστέθηκαν σε κάθε erpendorf και ακολούθησε επώαση σε θερμοκυκλοποιητή διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25°C για τον υβριδισμό των εκκινητών επάνω στο ιικό γονιδίωμα RNA, 50 λεπτά στους 42°C για τη σύνθεση του cDNA κλώνου, και 15 λεπτά στους 70°C για την αδρανοποίηση του ενζύμου.

3.9. Real-Time PCR

Η τεχνική της Real-Time PCR ή αλλιώς ποσοτικής PCR (quantitative PCR, qPCR) βασίζεται στη κλασική PCR, αλλά παρακολουθεί την ενίσχυση ενός επιθυμητού τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας μια φθορίζουσα χρωστική, στην παρούσα εργασία την SYBR Green, η οποία προσδένεται μη ειδικά σε δίκλωνο DNA, απορροφά στα 497nm και φθορίζει στα 520nm. Η ποσοτικοποίηση του αρχικού υπό μελέτη δείγματος είναι δυνατή μέσω της μέτρησης του εκπεμπόμενου φθορισμού και της κατασκευής ενός σχεδιαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου υπολογίζεται η τιμή του ουδού (Ct, Cycle threshold), ο πρώτος κύκλος δηλαδή στον οποίο η τιμή φθορισμού υπερβαίνει το κατώφλι (threshold) και το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα. Παράλληλα, δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη αρχικών αντιγράφων χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων σχετιζόμενα με την τιμή Ct, μέσω της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα των αρχικών αντιγράφων του υπό μελέτη δείγματος.

Η μελέτη της εξειδίκευσης της μεθόδου πραγματοποιείται με ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA (Melting Curve Analysis ή Dissociation Curve) κατά την οποία παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα της μεταβολής του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία και μετράται η κινητική της αποδιάταξης του ενισχυμένου θραύσματος. Οι μεγεθυσμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Τμήματα ίσου μήκους με ίδια αλληλουχία εμφανίζουν μεταβολή στο φθορισμό στην ίδια θερμοκρασία, λόγω του T_m, ενώ η εμφάνιση μεταβολής φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Ο υπολογισμός του ιικού τίτλου στα υπό μελέτη δείγματα έγινε με το σχεδιασμό μιας συγκριτικής (comparative) Real-Time PCR χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό control (normalizer) το γονίδιο GAPDH (γονίδιο housekeeping) και συγκρίνοντας τα αντίγραφα της περιοχής 5'-UTR των εντεροϊών στα υπό μελέτη δείγματα με τα αντίστοιχα αντίγραφα του θετικού μάρτυρα - virus control (calibrator). Το μήκος του ενισχυμένου τμήματος είναι 129 bp.

Στη μέθοδο αυτή κανονικοποιείται, για ένα δεδομένο δείγμα, η τιμή Ct της περιοχής στόχου (5' UTR) με την αντίστοιχη τιμή Ct του γονιδίου GAPDH. Πραγματοποιείται δηλαδή και μία δεύτερη PCR, υπό τις ίδιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών GAPDH R/GAPDH F για την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου GAPDH των μολυσμένων με ιό δειγμάτων, με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τον αριθμό των κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η θέση του γονιδιώματος που ενισχύουν σημειώνονται στον Πίνακα 3.9.1.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Θέση	Παραπομπή
ENV2	5'- CCCCTGAATGCGGCTAATC - 3'	5' UTR	Μονροεχο et al., 2000
ENV1	5'-GATTGTCAACCATAAGCAGC - 3'		
GAPDH R	5' – GTCTACCACCCTATTGCA – 3'	Γονίδιο	Tsakogiannis et al., 2014
GAPDH F	5' – CATCACCATCTTCCAGGA – 3'	GAPDH	

Πίνακας 3.9.1: Αλληλουχίες και θέσεις ενίσχυσης των εκκινητών ENV2/ENV1, GAPDH R/GAPDH F

Στο πειραματικό κομμάτι παρασκευάστηκαν δύο μείγματα, το ένα περιείχε τους εκκινητές ENV2/ENV1 και το άλλο τους εκκινητές GAPDH R/GAPDH F.

Το κάθε μείγμα περιείχε για την κάθε αντίδραση 1X Fast Gene Mix (Nippon Genetics), 10pmol από τον κάθε εκκινητή (ENV2 και ENV1 ή GAPDH R και GAPDH F), 50nM ROX Low και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 17μl/tube.

Σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0,2ml και προστέθηκαν 17μl από το μείγμα αυτό και 3μl από κάθε δείγμα cDNA. Κατόπιν, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις παρακάτω συνθήκες:

Πρώτος κύκλος	<ul style="list-style-type: none"> • 2 λεπτά στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	<ul style="list-style-type: none"> • 5 δευτερόλεπτα στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA • 30 δευτερόλεπτα στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων από το ένζυμο
Τελευταίος κύκλος	<ul style="list-style-type: none"> • Σταδιακή μετάβαση από τους 55°C στους 95°C για τη δημιουργία της καμπύλης τήξης (melting curve analysis)

3.10. Υπολογισμός τιμών CC_{50} , IC_{50} και SI

3.10.1. Υπολογισμός κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC_{50})

Η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (cytotoxic concentration 50%, CC_{50}) είναι μια τιμή που χρησιμοποιείται ως μέτρο για την έκφραση του επιπέδου τοξικότητας και ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία θα θανατώσει το ήμισυ (50%) των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια (Pritchett et al., 2014). Στην παρούσα εργασία η τιμή CC_{50} υπολογίστηκε με βάση την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) στα κύτταρα Rd στα πηγαδάκια με τις διάφορες συγκεντρώσεις των διαφορετικών δειγμάτων μελιού.

Συγκεκριμένα, με βάση τις παρατηρούμενες τιμές κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) κάθε δείγματος μελιού στις διάφορες συγκεντρώσεις του (30, 20, 10, 5 mg/ml) σχηματίστηκε μια γραφική παράσταση στο Excel, από την εξίσωση της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε μελιού (σε mg/ml) στην οποία παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί την κυτταροτοξική συγκέντρωση 50%, CC_{50} .

3.10.2. Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC_{50})

Η ανασταλτική συγκέντρωση 50% (inhibitory concentration 50%, IC₅₀) είναι μια τιμή που χρησιμοποιείται ως μέτρο της ισχύος μιας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Ειδικότερα, η τιμή IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί μείωση κατά το ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου (Pritchett et al., 2014). Στην παρούσα εργασία η τιμή IC₅₀ χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της αντι-ϊκής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του CVB5 και υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα της συγκριτικής ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου σχετικά με την μεταβολή στον αριθμό των ιικών αντιγράφων.

3.10.3. Υπολογισμός δείκτη επιλεκτικότητας (SI)

Τέλος, ο δείκτης επιλεκτικότητας (selectivity index, SI) είναι μία παράμετρος που εκφράζει την αποτελεσματικότητα μιας ουσίας, στην παρούσα εργασία των δειγμάτων μελιού, ως προς την αναστολή του ιικού στελέχους. Υπολογίζεται διαιρώντας την δεδομένη τιμή CC₅₀ της ουσίας προς την τιμή IC₅₀ (Cavalli et al., 2012). Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας ενός δείγματος μελιού, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι αυτό στην καταπολέμηση του ιού, επιτρέποντας την αναστολή του σε συγκεντρώσεις μικρότερες της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Αποτελέσματα τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων Rd

4.1.1. Τοξικότητα των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3,125% v/v

Στο στάδιο αυτό εξετάστηκαν δείγματα μελιού αραιωμένα σε θρεπτικό μέσο D-MEM σε συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v και ελεγχόταν καθημερινά η εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathogenic effect, CPE) μέχρι την εμφάνιση αλλοιώσεων στον αρνητικό μάρτυρα (c.c.).

Για όλα τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε ολική καταστροφή (CPE 4⁺) και μεταβολή της μορφολογίας των κυττάρων στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης, ήδη 24 ώρες μετά την έναρξη της επώασης. Εξαιρέση αποτέλεσε το συνθετικό μέλι στη συγκέντρωση 3,125% v/v, για το οποίο παρατηρήθηκε μικρή μόνο κυτταρική καταστροφή.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v εγκαταλείφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν νέες, μικρότερες συγκεντρώσεις μελιού εκφρασμένες σε mg/ml. Επιπλέον, καθώς δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατόπιν του φιλτραρίσματος των δειγμάτων μελιού ή/και της κατεργασίας τους με καταλάση (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), οι προσεγγίσεις αυτές εγκαταλείφθηκαν στην πορεία της παρούσας εργασίας και επιλέχθηκε η χρήση των δειγμάτων μελιού χωρίς καμία επεξεργασία ως η καταλληλότερη.

4.1.2. Τοξικότητα των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 30 mg/ml

Δείγματα μελιού χωρίς κατεργασία, αραιωμένα σε θρεπτικό μέσο D-MEM παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 30, 20, 10 και 5 mg/ml και οι κυτταροκαλλιέργειες εξετάζονταν καθημερινά και αρκετές φορές τη μέρα για την εμφάνιση κυτταροπαθολογικών δράσης.

Η οπτικά παρατηρηθείσα καταστροφή των κυττάρων Rd (κυτταροτοξικότητα) 48 ώρες μετά την προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων των μελιών στο κάθε πηγαδάκι της πλάκας μικροτιτλοποίησης εκφράστηκε ως τοις εκατό(%) ποσοστό επί του συνόλου των κυττάρων (δηλαδή, ποσοστό 100% αντιστοιχεί σε συνολική καταστροφή των κυττάρων, ποσοστό 0% αντιστοιχεί σε βιωσιμότητα του συνόλου των κυττάρων κ.ο.κ.) και τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.2.1. Όπως έχει προαναφερθεί, κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση προστίθεντο κάθε φορά σε τρία πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης και, επομένως, τα ποσοστά κυτταρικής καταστροφής που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα αποτελούν τον μέσο όρο των ποσοστών που παρατηρήθηκαν στα πηγαδάκια της κάθε τριπλέτας. Τα κύτταρα του cell control σε όλο το διάστημα 48 ωρών παρατήρησης δεν εμφάνισαν καμία καταστροφή. Επιπλέον, σημειώνεται ότι το μέλι Manuka προστέθηκε σε όλες τις πλάκες μαζί με δύο ακόμα δείγματα μελιού

κάθε φορά, οπότε τα ποσοστά κυτταροκαταστροφής που παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω για την κάθε συγκέντρωση του μελιού αυτού αποτελούν τον μέσο όρο των τιμών κυτταροτοξικότητας που καταγράφηκαν στην κάθε τριπλέτα πηγαδιών της κάθε πλάκας.

Α/Α	Δείγμα μελιού	Συγκεντρώσεις δειγμάτων (mg/ml)			
		30	20	10	5
1	Γλυκάνισος	100%	25%	12,5%	0%
2	Έλατο	66%	25%	0%	0%
3	Έλατο & Θυμαρί	84%	12,5%	0%	0%
4	Θυμαρί	100%	12,5%	0%	0%
5	Καστανιά	100%	25%	0%	0%
6	Κουμαριά	100%	87,5%	12,5%	6,25%
7	Πολυανθικό Ολύμπου	100%	75%	0%	0%
8	Πολυανθικό Αζώρου	91,7%	50%	12,5%	0%
	Manuka	38,4%	19%	0%	0%
	Συνθετικό	25%	0%	0%	0%

Πίνακας 4.1.2.1: Καταστροφή (% επί του συνόλου των κυττάρων) των κυττάρων Rd 48 ώρες μετά την προσθήκη των διαφόρων δειγμάτων μελιού στις διάφορες συγκεντρώσεις.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές συμπεραίνουμε, αρχικά, ότι όλα τα δείγματα μελιού προκάλεσαν σημαντική καταστροφή στα κύτταρα Rd όταν προστέθηκαν σε αυτά σε συγκέντρωση 30 mg/ml. Το μέλι Manuka εμφάνισε σαφώς καλύτερη εικόνα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ τη μικρότερη τοξικότητα σε αυτή τη συγκέντρωση προκάλεσε το συνθετικό μέλι (περίπου 1⁺).

Παρομοίως, κυτταρική καταστροφή παρατηρήθηκε και σε όλα τα πηγαδάκια με συγκέντρωση μελιών 20 mg/ml, αν και η κυτταροτοξικότητα όλων των δειγμάτων σε αυτή τη συγκέντρωση ήταν σαφώς μικρότερη από αυτή της συγκέντρωσης 30 mg/ml. Τα δείγματα Θυμαριού και Ελάτης-Θυμαριού προκάλεσαν σε αυτή τη συγκέντρωση μικρότερη καταστροφή ακόμα και από το μέλι Manuka, ενώ εξαίρεση αποτέλεσε το συνθετικό μέλι το οποίο δεν εμφάνισε καμία κυτταροτοξικότητα.

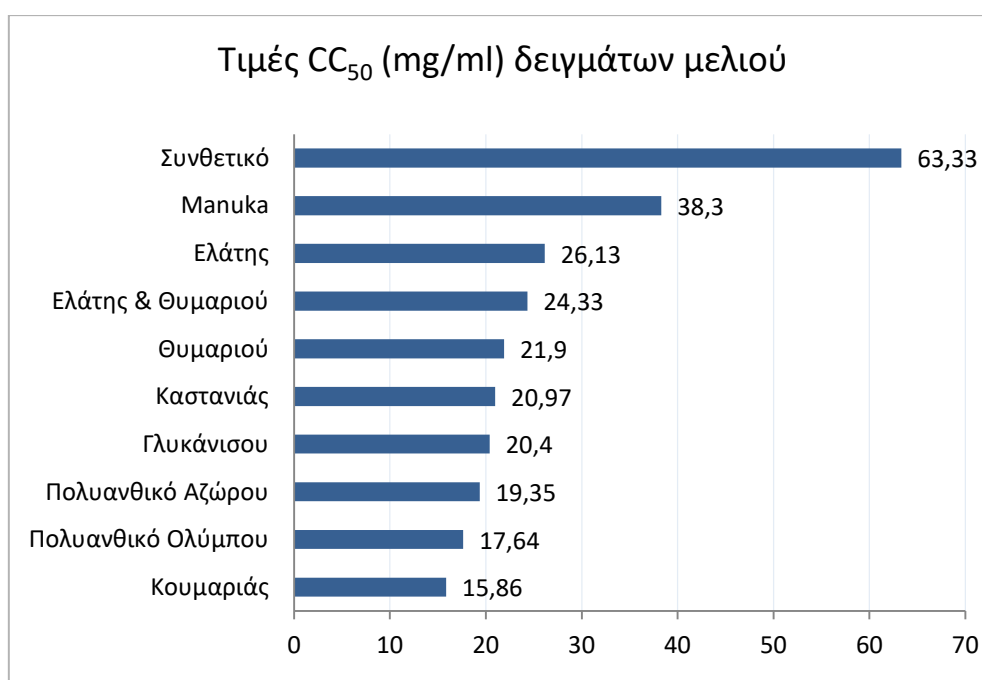
Στη συγκέντρωση 10 mg/ml τα περισσότερα δείγματα μελιού δεν προκάλεσαν καμία κυτταρική καταστροφή, με εξαίρεση τα μέλια Κουμαριάς, Γλυκανίσου και το πολυανθικό μέλι Αζώρου στα οποία παρατηρήθηκε μικρή κυτταροτοξικότητα.

Τέλος, στη συγκέντρωση 5 mg/ml η πλειοψηφία των δειγμάτων μελιού δεν προκάλεσε και πάλι καμία κυτταροτοξικότητα, με μόνη εξαίρεση το μέλι Κουμαριάς που προκάλεσε μικρή καταστροφή στα κύτταρα Rd.

4.1.3. Τιμές CC_{50} των δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η τιμή της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC_{50} , συγκέντρωση ουσίας που θανατώνει το ήμισυ των κυττάρων) υπολογίστηκε στο πρόγραμμα Excel από την γραφική παράσταση που προέκυψε για το κάθε δείγμα μελιού με βάση τον μέσο όρο της παρατηρηθείσας κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) στα τρία πηγαδάκια της κάθε συγκέντρωσης (30, 20, 10 και 5 mg/ml) του εκάστοτε δείγματος. Ειδικότερα για το μέλι Manuka, το οποίο προστέθηκε σε όλες τις πλάκες μικροτιτλοποίησης, η τιμή CC_{50} υπολογίστηκε με βάση τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων όλων των πλακών.

Στο Διάγραμμα 4.1.3.1 παρουσιάζονται οι τιμές CC_{50} όλων των δειγμάτων μελιού εκφρασμένες σε mg/ml.



Διάγραμμα 4.1.3.1: Τιμές CC_{50} (mg/ml) των δειγμάτων μελιού κατά φθίνουσα ταξινόμηση

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το μέλι Κουμαριάς εμφανίζει την μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων Rd (τιμή CC_{50} 15,86 mg/ml), ακολουθούμενο από το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου (τιμή CC_{50} 17,64 mg/ml). Αντίθετα, το μέλι Ελάτης εμφανίζει την μικρότερη τοξικότητα (τιμή CC_{50} 26,13 mg/ml), ως προς τα υπόλοιπα προς εξέταση δείγματα.

Συνολικά, το μέλι Manuka προκαλεί τη μικρότερη τοξικότητα στα κύτταρα Rd σε σχέση με τα οκτώ προς εξέταση δείγματα μελιού, με τιμή CC_{50} 38,3 mg/ml, τιμή που είναι μικρότερη μόνο από αυτή του συνθετικού μελιού, ενός μείγματος σακχάρων, το οποίο και εμφανίζει την μικρότερη τοξικότητα απ'όλα τα δείγματα (τιμή CC_{50} 63,33 mg/ml).

4.2. Αποτελέσματα αντι-ικικής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού CVB5

Για τη μελέτη της αντι-ικικής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού Coxsackie B5, αρχικά έγινε καθημερινή παρατήρηση και καταγραφή της κυτταροπαθογόνου δράσης στα ενοφθαλμισμένα με ιό πηγαδάκια της εκάστοτε πλάκας μικροτιτλοποίησης. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, και σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις της κυτταροτοξικότητας που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα και πραγματοποιήθηκαν παράλληλα, επιλέχθηκαν οι δύο συγκεντρώσεις (10 και 5 mg/ml) για τις οποίες πραγματοποιήθηκε συγκριτική Real-Time PCR με σκοπό την ακριβή ποσοτικοποίηση των ιικών αντιγράφων και τον μετέπειτα υπολογισμό των τιμών IC_{50} και S.I.

4.2.1. Κυτταροπαθογόνος δράση στα μολυσμένα με ιό δείγματα

Ο ιικός τίτλος 10^2 $CCID_{50}$ / 0,1 ml του CVB5 που χρησιμοποιήθηκε προκαλεί συνολική καταστροφή στα κύτταρα Rd του θετικού control(v.c.) 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης.

Η κυτταροπαθογόνος δράση (CPE) στα ενοφθαλμισμένα με ιό πηγαδάκια με τα διάφορα δείγματα μελιού στις διάφορες συγκεντρώσεις τους (30, 20, 10, 5

mg/ml) παρατηρήθηκε παράλληλα με την CPE στα δείγματα μελιού χωρίς κατεργασία (βλ. Ενότητα 4.1.2), έως και 48 ώρες μετά την έναρξη της επώασης.

Από τα αποτελέσματα αυτά (δεν παρουσιάζονται) προέκυψε ότι όλα τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν, πλην του συνθετικού, εμφάνισαν αντι-ικική δράση στις μικρότερες συγκεντρώσεις τους, 10 και 5 mg/ml. Η παρατηρηθείσα, δηλαδή, καταστροφή των κυττάρων Rd μετά το πέρας 48 ωρών στα πηγαδάκια με τις δύο αυτές συγκεντρώσεις του κάθε μελιού ήταν σαφώς μικρότερη σε σχέση με την κυτταρική καταστροφή στα πηγαδάκια του θετικού μάρτυρα, η οποία ήταν συνολική (100% των κυττάρων).

Λόγω αυτής της παρατήρησης και λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα που περιγράφονται στην ενότητα 4.1 σχετικά με την κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων μελιού, για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου που ακολούθησε μετρήθηκε ο ιικός τίτλος στα πηγαδάκια με συγκεντρώσεις μελιού 10 και 5 mg/ml.

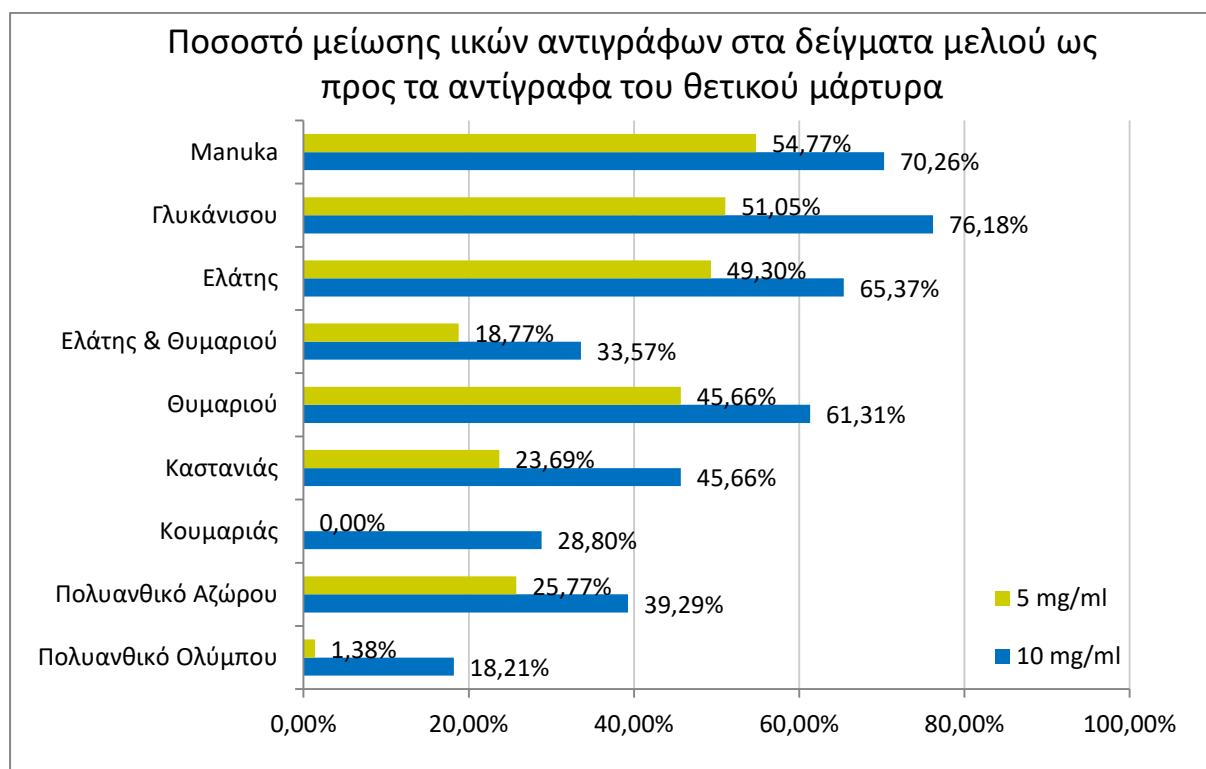
4.2.2. Αποτελέσματα qPCR και τιμές IC_{50} των δειγμάτων

Μετά την εκχύλιση του ιικού RNA από τα πηγαδάκια (ανά τριπλέτες) με συγκέντρωση μελιού 10 και 5 mg/ml και την αντίστροφη μεταγραφή προς DNA, ακολούθησε μια συγκριτική ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με το εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 για την μέτρηση των αντιγράφων της περιοχής 5' UTR των εντεροϊών. Το μέγεθος του προϊόντος ήταν 129 bp. Ως εσωτερικό control (normalizer) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τον αριθμό κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH που ενισχύθηκε με το ζεύγος εκκινητών GAPDH R/GAPDH F.

Ως αρνητικός μάρτυρας στην qPCR χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της. Οι καμπύλες αποδιάταξης (Melting Curves ή Dissociation Curves) έδειξαν ότι όλα τα δείγματα έχουν δώσει ειδικό προϊόν και δεν υπάρχει επιμόλυνση στο νερό (δεν παρουσιάζονται).

Στο Διάγραμμα 4.2.2.1 έχει εκφραστεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων στα πηγαδάκια με συγκεντρώσεις 10 και 5 mg/ml των δειγμάτων μελιού ως τοις εκατό

ποσοστό μείωσης επί του αριθμού των ικών αντιγράφων στον θετικό μάρτυρα (v.c.). Δηλαδή, τα ικά αντίγραφα του CVB5 που μετρήθηκαν στην qPCR στα πηγαδάκια του θετικού μάρτυρα θεωρούνται ως ποσοστό 0% και ως προς αυτά εκφράζεται η μείωση των ικών αντιγράφων που μετρήθηκε στα ενοφθαλμισμένα με ιό πηγαδάκια με τα δείγματα μελιού. Ειδικότερα για το μέλι Manuka, το οποίο προστέθηκε σε όλες τις πλάκες μικροτιτλοποίησης, τα ποσοστά που παρουσιάζονται αποτελούν τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων όλων των πλακών. Επίσης, για το συνθετικό μέλι δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στον αριθμό των ικών αντιγράφων στις δύο συγκεντρώσεις 10 και 5 mg/ml σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, οπότε δεν παρουσιάζεται στο παρακάτω Διάγραμμα.



Διάγραμμα 4.2.2.1: Ποσοστό μείωσης ικών αντιγράφων στα ενοφθαλμισμένα με ιό πηγαδάκια των δειγμάτων μελιού σε συγκεντρώσεις 10 και 5 mg/ml, σε σχέση με τα αντίγραφα του θετικού μάρτυρα (v.c.).

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι μεγαλύτερη μείωση στον αριθμό των ικών αντιγράφων παρατηρήθηκε γενικά σε όλα τα δείγματα μελιού σε συγκέντρωση 10 mg/ml, σε σχέση με τη συγκέντρωση 5 mg/ml.

Την απόλυτα μεγαλύτερη μείωση του ικού τίτλου σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα εμφάνισε το μέλι Γλυκάνισου (76,18%) σε συγκέντρωση 10 mg/ml, μεταξύ

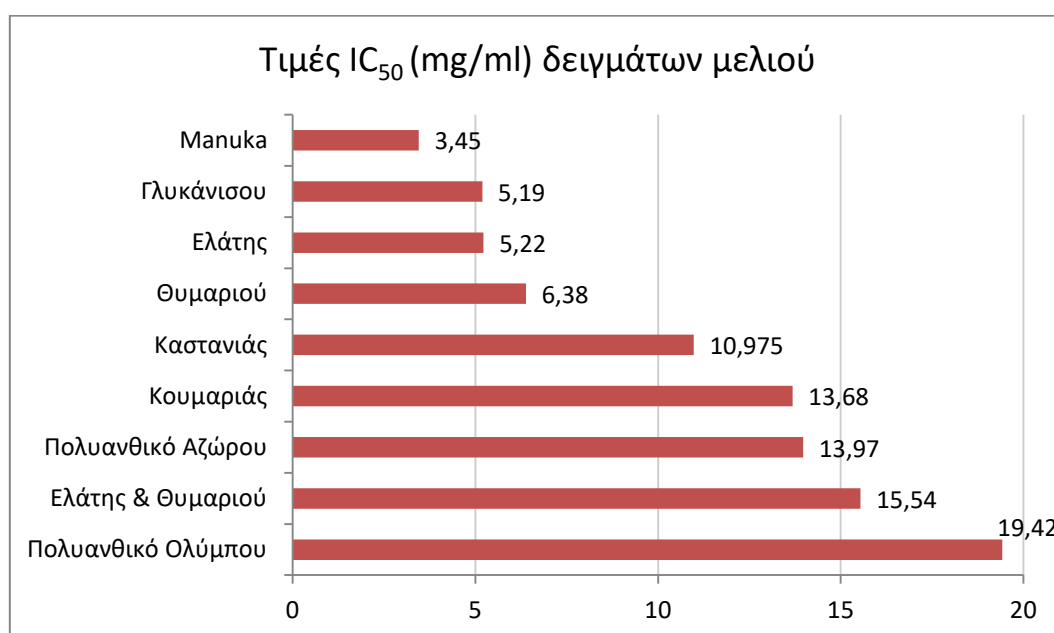
όλων των δειγμάτων. Το μέλι Manuka έδειξε τη μεγαλύτερη μείωση στον αριθμό των ιικών αντιγράφων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα στη συγκέντρωση 5 mg/ml ως προς τα υπόλοιπα δείγματα, με ποσοστό 54,77%.

Αντίθετα, μηδενική μείωση στα ιικά αντίγραφα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα σημείωσε το μέλι Κουμαριάς σε συγκέντρωση 5 mg/ml, η χειρότερη επίδοση απ'όλα τα δείγματα. Για τη συγκέντρωση 10 mg/ml, η μικρότερη μείωση μεταξύ των δειγμάτων παρατηρήθηκε στο Πολυανθικό μέλι Ολύμπου, με ποσοστό 18,21% σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

Με βάση τα αποτελέσματα της qPCR σχετικά με την ιική αναστολή στις συγκεντρώσεις 10 και 5 mg/ml των δειγμάτων μελιού, σχεδιάστηκε μια γραφική παράσταση στο Excel για τον υπολογισμό της τιμής IC₅₀ του κάθε δείγματος, της συγκέντρωσης δηλαδή του μελιού που προκαλεί μείωση κατά το ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το δείγμα μελιού στην αναστολή του ιού.

Ειδικότερα για το μέλι Manuka, το οποίο προστέθηκε σε όλες τις πλάκες μικροτιτλοποίησης, η τιμή IC₅₀ υπολογίστηκε με βάση τον μέσο όρο των αποτελεσμάτων όλων των πλακών. Επιπλέον, για το συνθετικό μέλι δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί τιμή IC₅₀ καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία ιική αναστολή στην qPCR.

Στο Διάγραμμα 4.2.2.2 παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ όλων των δειγμάτων μελιού εκφρασμένες σε mg/ml.



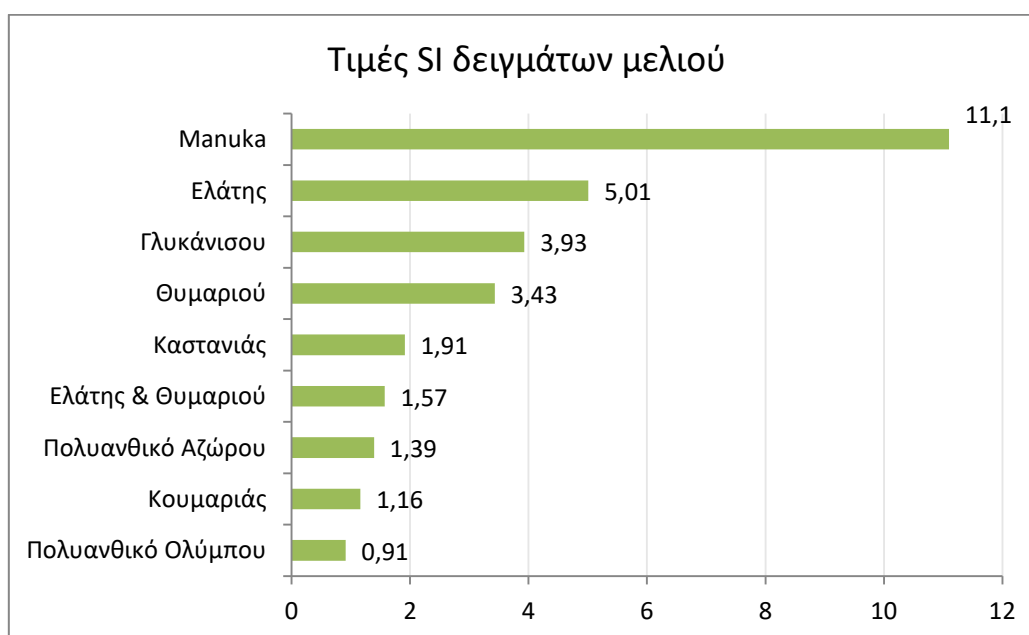
Διάγραμμα 4.2.2.2: Τιμές IC_{50} (mg/ml) των δειγμάτων μελιού κατά αύξουσα σειρά

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το μέλι Μανουκά (τιμή IC_{50} 3,45 mg/ml) εμφανίζεται ως το πλέον αποτελεσματικό στην αναστολή του ιού σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, καθώς επιτυγχάνει κατά το ήμισυ μείωση του ιικού τίτλου σε συγκέντρωση μόλις 3,45 mg/ml. Ακολουθούν τα μέλια Γλυκάνισου και Ελάτης με παραπλήσιες τιμές IC_{50} , 5,19 και 5,22 mg/ml αντίστοιχα. Την μεγαλύτερη τιμή IC_{50} (19,42 mg/ml) σημείωσε το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου, γεγονός που υποδεικνύει μειωμένη ικανότητα αναστολής του ιού συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

4.2.3. Τιμές SI των δειγμάτων

Η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας (Selectivity index, SI) για το κάθε δείγμα μελιού υπολογίζεται διαιρώντας την τιμή CC_{50} του δείγματος προς την αντίστοιχη τιμή IC_{50} . Ο υπολογισμός του δείκτη επιλεκτικότητας είναι σημαντικός, καθώς παρέχει μια ένδειξη για τον βαθμό στον οποίο η παρατηρούμενη μείωση των ιικών αντιγράφων οφείλεται σε τοξική επίδραση του μελιού στα κύτταρα - ξενιστές του ιού, ή σε απευθείας ανασταλτική επίδραση του στον ιό.

Οι τιμές SI για τα δείγματα μελιού παρατίθενται στο Διάγραμμα 4.2.3.1. Για το συνθετικό μέλι δεν υπολογίστηκε τιμή IC_{50} , όπως προαναφέρθηκε, επομένως δεν μπορεί να υπολογιστεί και τιμή SI.



Διάγραμμα 4.2.3.1: Τιμές δείκτη επιλεκτικότητας(SI) των δειγμάτων μελιού κατά φθίνουσα σειρά

Όπως διακρίνεται στο διάγραμμα, όλα τα δείγματα μελιού, με μόνη εξαίρεση το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου, εμφάνισαν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας (>1). Αυτό σημαίνει ότι για τα δείγματα αυτά η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (CC₅₀) είναι μεγαλύτερη από την ανασταλτική συγκέντρωση 50% (IC₅₀), δηλαδή τα μέλια αυτά αναστέλλουν κατά το ήμισυ τον τίτλο του ιού Coxsackie B5 σε συγκέντρωση που δεν είναι ακόμα τοξική για το ήμισυ των κυττάρων Rd στην κυτταροκαλλιέργεια. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή SI, τόσο πιο επιλεκτικό είναι το δείγμα μελιού στην αναστολή του ιικού στελέχους. Για ένα ορισμένο δείγμα μελιού, μεγαλύτερη τιμή CC₅₀ (δηλαδή μικρότερη κυτταροτοξικότητα) και μικρότερη τιμή IC₅₀ (δηλαδή μεγαλύτερη ιική αναστολή) συνεπάγεται μεγαλύτερη τιμή SI.

Η μικρότερη της μονάδος (<1) τιμή SI που εμφάνισε το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο μέλι εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων Rd παρά ανασταλτική επίδραση έναντι του ιού. Η τιμή CC₅₀ (17,64 mg/ml) του συγκεκριμένου μελιού είναι μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή του IC₅₀ (19,42 mg/ml).

Την μεγαλύτερη τιμή δείκτη επιλεκτικότητας, και μάλιστα με διαφορά έναντι των υπολοίπων δειγμάτων, εμφάνισε το μέλι Manuka (11,1), ακολουθούμενο από το μέλι Ελάτης (5,01). Την μικρότερη τιμή εμφάνισε, όπως προαναφέρθηκε, το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μέλι κατέχει για αιώνες επιφανή θέση στην παραδοσιακή ιατρική. Οι μεγάλοι πολιτισμοί της Ιστορίας εκτιμούσαν τις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού και το χρησιμοποιούσαν για την ανακούφιση του πόνου, των πληγών και ασθενειών του εντερικού συστήματος, μεταξύ άλλων. Στις μέρες μας, αν και η δυνατότητα θεραπευτικής χρήσης του μελιού έχει αποτελέσει πεδίο αντιπαράθεσης, μελετάται επισταμένα για τις αντιμικροβιακές και εν γένει ευεργετικές για τον άνθρωπο

ιδιότητες του (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013; Samarghandian et al., 2017; Zumla & Lulat, 1989).

Η επιστημονική μελέτη τα τελευταία χρόνια υποδεικνύει την ύπαρξη αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και καρδιοπροστατευτικής δραστηριότητας του μελιού (Ahmed et al., 2018; Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013; Samarghandian et al., 2017). Η επούλωση πληγών και οι θετικές γαστρεντερολογικές επιδράσεις αποτελούν επίσης δύο καλά μελετημένες και γνωστές από την αρχαιότητα δράσεις του μελιού (Ajibola et al., 2012; Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013; Mandal et al., 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι *in vitro* μελέτες σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού έναντι ενός πλήθους παθογόνων βακτηρίων, ιών και μυκήτων, αν και η αντι-ική επίδραση του μελιού, που αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, έχει μελετηθεί λιγότερο επισταμένα σε σχέση με την αντιβακτηριακή. Αντι-ική δράση του μελιού έχει αναφερθεί σε μελέτες έναντι του ιού του απλού έρπητα και του ιού της Ερυθράς, καθώς και έναντι του ιού έρπητα ζωστήρα σε μελέτη σε ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo), που έδειξε μείωση των ικών πλακών μετά από προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλιού (Ahmed et al., 2018; Shahzad & Cohrs, 2012). Αντίστοιχη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί σε πρότυπη κυτταρική σειρά νεφρών σκύλου (Madin-Darby canine kidney cell line, MDCK) για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας και της αντι-ικής δράσης διάφορων δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης, με παρόμοια αποτελέσματα (Watanabe et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν οκτώ (8) διαφορετικά δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας ως προς την τοξικότητα τους έναντι κυτταρικής σειράς ραβδομυοσαρκώματος (Rd) καθώς και ως προς την δραστηριότητα τους έναντι του εντεροϊού Coxsackie B5. Η κυτταροτοξικότητα και η αντι-ική δράση αυτών των μελιών συγκρίθηκε με αυτή ενός δείγματος μελιού Manuka με δείκτη UMF24+ (από τις υψηλότερες τιμές διαθέσιμες στην αγορά), καθώς και ενός συνθετικού μελιού που αποτελεί ένα εργαστηριακά παρασκευασμένο μείγμα σακχάρων.

Τα κύτταρα Rd επώαστηκαν σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (96-well plate). Μία σειρά (συνολικά 12 θέσεις/πηγαδάκια) της πλάκας αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα (cell control, c.c.) που περιείχε μόνο κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο D-MEM

και άλλη σειρά αποτέλεσε τον θετικό μάρτυρα (virus control, v.c.) που περιείχε κύτταρα Rd ενοφθαλισμένα με εναιώρημα ιού CVB5 σε συγκέντρωση 10^2 CCID₅₀ / 0,1 ml. Τρία διαφορετικά δείγματα μελιού εξετάζονταν στην κάθε πλάκα. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας του κάθε μελιού, σε μία σειρά της πλάκας προστίθεντο το συγκεκριμένο δείγμα μελιού αραιωμένο σε θρεπτικό D-MEM σε διάφορες συγκεντρώσεις (τριπλέτα πηγαδιών ανά μέλι ανά συγκέντρωση, βλ. Εικόνα 3.5.2.1). Στο πρώτο σκέλος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μελιού: 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v, και στη συνέχεια μικρότερες: 30, 20, 10 και 5 mg/ml. Για τον έλεγχο της αντι-ικκής δράσης του κάθε μελιού, σε μία σειρά της πλάκας προστίθεντο το συγκεκριμένο δείγμα μελιού αραιωμένο σε θρεπτικό D-MEM σε διάφορες συγκεντρώσεις (30, 20, 10, 5 mg/ml), παρουσία εναιωρήματος 10^2 CCID₅₀ ιού CVB5 (τριπλέτα πηγαδιών ανά μέλι ανά συγκέντρωση, βλ. Εικόνα 3.5.2.1). Η μόλυνση της κυτταρικής σειράς Rd με τον ιό πραγματοποιούνταν μετά από επώαση μίας ώρας (1h) του ιού παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των δειγμάτων μελιού.

Η παρατηρηθείσα κυτταροτοξικότητα και αντι-ικκή δράση καταγράφηκε ως εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathogenic effect, CPE) στα κύτταρα Rd, σε μια κλίμακα τιμών CPE από 1⁺ (καταστροφή στο 25% περίπου των κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι) έως 4⁺ (συνολική, 100% καταστροφή των κυττάρων). Η παρατήρηση των κυττάρων στον ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο ήταν καθημερινή και συνολικά από την έναρξη της επώασης διήρκησε 48 ώρες. Το πρώτο βήμα για την ποσοτικοποίηση του ιικού τίτλου στο κάθε δείγμα είναι η εκχύλιση του ιικού RNA. Στη συνέχεια, καθώς το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, η αντίστροφη μεταγραφή του RNA προς σύνθεση ενός cDNA είναι απαραίτητη ώστε να ακολουθήσει η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR) και η ενίσχυση συγκεκριμένης περιοχής του ιικού γενώματος.

Τα αποτελέσματα της τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι της κυτταρικής σειράς Rd εκφράστηκαν αφενός με την οπτική εκτίμηση της έκτασης της κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) για το κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση και, αφετέρου, με τον υπολογισμό της τιμής της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης 50% (CC₅₀) για το κάθε δείγμα.

Με βάση τις παρατηρήσεις της CPE για το κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση, έγινε εμφανές ότι όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του Manuka, προκάλεσαν ολική καταστροφή (CPE 4⁺) και μεταβολή της μορφολογίας των κυττάρων στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 50, 25, 12,5, 6,25 και 3,125% v/v που εξετάστηκαν αρχικά. Εξαιρέση αποτέλεσε το συνθετικό μέλι, ένα μείγμα σακχάρων, στη συγκέντρωση 3,125% v/v, για το οποίο παρατηρήθηκε μικρή μόνο κυτταρική καταστροφή.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στις οποίες βρέθηκε ότι συγκεντρώσεις μελιού της τάξης του 3-5% v/v περίπου ή μεγαλύτερες εμφανίζουν τοξικότητα έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018; Minden-Birkenmaier et al., 2019; Muhammad, 2012). Η επίδραση αυτή έχει προταθεί ότι μπορεί να οφείλεται στο χαμηλό pH και την υψηλή οσμωτικότητα του μελιού (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018).

Σε ό,τι αφορά τα δείγματα μελιού αραιωμένα σε μικρότερες συγκεντρώσεις (30, 20, 10 και 5 mg/ml) όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του Manuka, προκάλεσαν καταστροφή στα κύτταρα Rd όταν προστέθηκαν σε αυτά σε συγκέντρωση 30 ή 20 mg/ml. Μοναδική εξαίρεση ήταν και πάλι το συνθετικό μέλι το οποίο προκάλεσε μηδενική έως ελάχιστη κυτταροτοξικότητα στις συγκεντρώσεις αυτές, ενώ έχει ενδιαφέρον ότι τα δείγματα Θυμαριού και Ελάτης-Θυμαριού προκάλεσαν σε συγκέντρωση 20 mg/ml μικρότερη καταστροφή από το μέλι Manuka. Στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις, 10 και 5 mg/ml, τα περισσότερα δείγματα μελιού δεν προκάλεσαν καμία κυτταρική καταστροφή, με μόνη εξαίρεση τα μέλια Κουμαριάς, Γλυκάνισου και το πολυανθικό μέλι Αζώρου στα οποία παρατηρήθηκε μικρή κυτταροτοξικότητα σε συγκέντρωση 10 mg/ml, αλλά και σε συγκέντρωση 5 mg/ml για το μέλι Κουμαριάς.

Σε αντίστοιχη μελέτη των Imtara et al. εξετάστηκαν συνολικά 12 μέλια διαφόρων βοτανικών πηγών από την Παλαιστίνη και το Μαρόκο σε διάφορες συγκεντρώσεις 0 - 2000 µg/ml, ως προς την τοξικότητα τους έναντι ανθρώπινων κυτταρικών σειρών εντερικού καρκινώματος και καρκινώματος του μαστού. Τα αποτελέσματα διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, και σε συγκέντρωση μελιών 2000 µg/ml η τοξικότητα βρέθηκε μικρότερη σε κύτταρα καρκινώματος του μαστού σε σχέση με κύτταρα εντερικού καρκινώματος. Στην πρώτη κυτταρική σειρά η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές σε σχέση με αυτή στον αρνητικό μάρτυρα για κανένα δείγμα μελιού που εξετάστηκε, ενώ στην

δεύτερη οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ήταν μεγαλύτερες και η σημαντικότερη μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα που μετρήθηκε ήταν 42% ως προς τον αρνητικό μάρτυρα, για ένα δείγμα μελιού κάππαρης. Οι ερευνητές εντόπισαν επίσης διαφορές στη σύσταση μεταξύ των δειγμάτων μελιού ως προς ορισμένα φαινορικά συστατικά, οι οποίες πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική βοτανική προέλευση των μελιών και στις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (Imtara et al., 2019). Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει τη διακύμανση που μπορεί να εμφανίζεται στα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών για ένα ορισμένο δείγμα μελιού, ή μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων μελιού για μία ορισμένη κυτταρική σειρά. Η διακύμανση αυτή μπορεί να οφείλεται, στην πρώτη περίπτωση, στην διαφορετική επίδραση των συστατικών ενός δείγματος μελιού στην εκάστοτε κυτταρική σειρά ή στη διαφορετική φύση των καρκινικών κυττάρων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση μπορεί να οφείλεται στις διαφορές στο είδος και την ποσότητα των συστατικών που περιέχονται στο κάθε μέλι (Imtara et al., 2019). Οι διαφορές στη σύσταση των μελιών μπορεί να εξηγούν τις διαφορές στην τοξικότητα που προκαλούν στα κύτταρα, οι οποίες παρατηρήθηκαν και στην παρούσα πτυχιακή εργασία μεταξύ των δειγμάτων.

Σε άλλη μελέτη, σύμφωνα με τους Sadeghi-Aliabadi et al., μέλι Αστραγάλου από το Ιράν εμφάνισε κυτταροτοξικότητα έναντι κυτταρικής σειράς ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος και καρκινώματος της ουροδόχου κύστης, καθώς και φυσιολογικών ινοβλαστών ποντικού, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε συγκέντρωση μελιού 6% w/v η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν μικρότερη από 20% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και για τις 3 κυτταρικές σειρές, 48 ώρες μετά την προσθήκη του μελιού. Επιπλέον, οι ερευνητές μελέτησαν παράλληλα και την κυτταροτοξικότητα μείγματος σακχάρων (συνθετικού μελιού) το οποίο και βρέθηκε να προκαλεί μικρότερη τοξικότητα στις κυτταρικές σειρές σε σχέση με το μέλι, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας (Sadeghi-Aliabadi et al., 2015).

Η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (CC₅₀) υπολογίστηκε για το κάθε δείγμα μελιού στην παρούσα εργασία με βάση την παρατηρηθείσα οπτικά και εκφρασμένη ως CPE κυτταρική καταστροφή στα πηγαδάκια του κάθε δείγματος στις διάφορες αραιώσεις του. Πρόκειται για την συγκέντρωση του κάθε μελιού (σε mg/ml) στην οποία παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό

κυτταροκαλλιέργεια. Τα αποτελέσματα έδειξαν, συνολικά, ότι το μέλι Κουμαριάς εμφανίζει την μικρότερη τιμή CC_{50} (15,86 mg/ml) και άρα την μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων Rd, ενώ το συνθετικό μέλι εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή CC_{50} (63,33 mg/ml) και άρα την μικρότερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων Rd σε σχέση με όλα τα δείγματα, ακολουθούμενο από το μέλι Manuka με τιμή CC_{50} 38,3 mg/ml.

Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, έρευνα των Watanabe et al. για την κυτταροτοξικότητα και την αντι-ικκή δράση δειγμάτων μελιού, συμπεριλαμβανομένου μελιού Manuka, έναντι του ιού της γρίπης σε πρότυπη κυτταρική σειρά νεφρών σκύλου (Madin-Darby canine kidney cell line, MDCK), δεν βρήκε ιδιαίτερες διαφορές στις τιμές CC_{50} μεταξύ των δειγμάτων. Επιπλέον, όλες οι τιμές κυμάνθηκαν περίπου στα 81 mg/ml, όντας δηλαδή σαφώς μεγαλύτερες από αυτές που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία (Watanabe et al., 2014).

Στην παρούσα πτυχιακή, η αντι-ικκή δράση των δειγμάτων μελιού εκτιμήθηκε με βάση τον ακριβή υπολογισμό της μείωσης των ιικών αντιγράφων από τα αποτελέσματα της Real-Time PCR στις συγκεντρώσεις 10 και 5 mg/ml των δειγμάτων, καθώς και με βάση τον υπολογισμό της τιμής του δείκτη επιλεκτικότητας(SI) για το κάθε δείγμα μελιού.

Από την Real-Time PCR προέκυψε ότι όλα τα δείγματα μελιού προκάλεσαν μείωση στον αριθμό των ιικών αντιγράφων και στις δύο συγκεντρώσεις (10 και 5 mg/ml) που εξετάστηκαν, με μόνη εξαίρεση το μέλι Κουμαριάς σε συγκέντρωση 5 mg/ml. Μεγαλύτερη μείωση στα ιικά αντίγραφα παρατηρήθηκε, γενικά, στα πηγαδάκια όλων των δειγμάτων μελιού σε συγκέντρωση 10 mg/ml, σε σχέση με τη συγκέντρωση 5 mg/ml. Το συνθετικό μέλι δεν προκάλεσε μείωση στον αριθμό των ιικών αντιγράφων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα στις δύο αυτές συγκεντρώσεις και επομένως συμπεραίνουμε ότι η περιεκτικότητα του μελιού σε σάκχαρα δεν μπορεί να είναι υπεύθυνη από μόνη της για τις αντι-ικκές του ιδιότητες.

Το μέλι Γλυκάνισου, σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα δείγματα, σε συγκέντρωση 10 mg/ml εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση ιικών αντιγράφων (ποσοστό 76,18%) ως προς τον θετικό μάρτυρα, 48 ώρες μετά την έναρξη της μόλυνσης. Το μέλι Manuka έδειξε τη μεγαλύτερη μείωση ιικών αντιγράφων σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα στη συγκέντρωση 5 mg/ml ως προς τα υπόλοιπα δείγματα, με ποσοστό 54,77%. Την

μικρότερη, πρακτικά μηδενική, ική αναστολή σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα εμφάνισε το μέλι Κουμαριάς στη συγκέντρωση 5 mg/ml, ακολουθούμενο από το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου, με ποσοστό μείωσης μόλις 1,38% στη συγκέντρωση 5 mg/ml και 18,21% στη συγκέντρωση 10 mg/ml.

Με βάση τα αποτελέσματα της συγκριτικής ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου υπολογίστηκε η ανασταλτική συγκέντρωση 50% (IC_{50}) για το κάθε δείγμα μελιού, τιμή που ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας (μελιού) που προκαλεί μείωση κατά το ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν, συνολικά, ότι το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή IC_{50} (19,42 mg/ml) και άρα μικρότερη αποτελεσματικότητα έναντι του ιού CVB5, ενώ το μέλι Manuka εμφανίζει την μικρότερη τιμή IC_{50} (3,45 mg/ml) και άρα την αποτελεσματικότερη ική αναστολή σε σχέση με όλα τα δείγματα.

Αντίστοιχη έρευνα για την αντι-ική δράση δειγμάτων μελιού πραγματοποιήθηκε από τους Watanabe et al. σε πρότυπη κυτταρική σειρά νεφρών σκύλου (MDCK) εξετάζοντας τη δράση των μελιών έναντι του ιού της γρίπης. Σε συμφωνία με την παρούσα εργασία, οι ερευνητές βρήκαν ότι όλα τα δείγματα μελιού που εξέτασαν εμφάνισαν αντι-ική δράση έναντι του ιού της γρίπης και το μέλι Manuka είχε την ισχυρότερη επίδραση. Επιπλέον, η τιμή IC_{50} του Manuka σε εκείνη την μελέτη βρέθηκε να είναι περίπου 3,6 mg/ml, παραπλήσια δηλαδή με αυτή που υπολογίστηκε στην παρούσα εργασία (3,45 mg/ml) (Watanabe et al., 2014). Άλλη έρευνα σε ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo) έδειξε μείωση των ιικών πλακών ιού έρπητα ζωστήρα, μετά από προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλιού σε συγκεντρώσεις 0 - 6% wt/vol (Shahzad & Cohrs, 2012).

Το πηλίκο των τιμών CC_{50} προς IC_{50} για το κάθε δείγμα μελιού καλείται δείκτης επιλεκτικότητας (Selectivity Index, SI). Όσο υψηλότερη είναι η τιμή SI για ένα δείγμα μελιού, τόσο πιο αποτελεσματικό έναντι του ιού-στόχου και παράλληλα ασφαλές για τα κύτταρα είναι το συγκεκριμένο δείγμα (Cavalli et al., 2012). Από τον υπολογισμό προέκυψε ότι στην παρούσα εργασία όλα τα δείγματα μελιού, με μόνη εξαίρεση το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου, εμφάνισαν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας (>1), δηλαδή ανέστειλαν κατά το ήμισυ τον τίτλο του ιού Coxsackie B5 σε συγκέντρωση που δεν είναι ακόμα τοξική για το ήμισυ των κυττάρων Rd στην

κυτταροκαλλιέργεια. Την μεγαλύτερη τιμή δείκτη επιλεκτικότητας, και μάλιστα με διαφορά έναντι των υπολοίπων δειγμάτων, εμφάνισε το μέλι Manuka (11,1), ακολουθούμενο από το μέλι Ελάτης (5,01), ενώ την μικρότερη, όπως προαναφέρθηκε, το Πολυανθικό μέλι Ολύμπου (0,91).

Οι Watanabe et al. στην έρευνα τους ανέφεραν τιμές SI κυμαινόμενες από 22,9 (για το μέλι Manuka) έως 7,1, τιμές γενικά υψηλότερες από αυτές που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία, γεγονός που οφείλεται στις υψηλότερες τιμές CC₅₀ που βρέθηκαν σε εκείνη την έρευνα (Watanabe et al., 2014).

Ανακεφαλαιωτικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι όλα τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν αραιωμένα σε θρεπτικό μέσο D-MEM είναι γενικά ασφαλή για τα κύτταρα Rd σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 20 mg/ml, εμφανίζοντας μια δοσοεξαρτώμενη μείωση στην κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, όλα τα εξεταζόμενα ελληνικά δείγματα μελιού εμφάνισαν αντι-ικκή δραστηριότητα έναντι του CVB5, ενώ η αντιμικροβιακή επίδραση του μελιού Manuka επιβεβαιώθηκε εκ νέου. Τη στιγμή συγγραφής της παρούσας εργασίας, απ'ό,τι είναι γνωστό, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες παρόμοιες μελέτες που να εξετάζουν ελληνικά μέλια και μέλι Manuka ως προς την αντι-ικκή τους επίδραση έναντι του Coxsackie B5 ή την τοξικότητα τους έναντι κυτταρικής σειράς Rd.

Συνολικά, το μέλι Manuka εμφανίστηκε ως το πιο αποτελεσματικό έναντι του ιού και ταυτόχρονα ασφαλές για τα κύτταρα δείγμα στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα όμως, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν με σαφήνεια τις μοναδικές ιδιότητες ορισμένων ελληνικών μελιών τα οποία συναγωνίζονται το Manuka ως προς την ασφάλεια τους για τα κύτταρα αλλά και ως προς την ανασταλτική τους επίδραση έναντι του ικού στελέχους και υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη των ελληνικών μελιών με χρησιμοποίηση διαφορετικών κυτταρικών σειρών και διαφορετικών ικών στελεχών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdulkhaliq, A. & Swaileh, M. K. (2017). Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 447-454
- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*, 343(4), 651–659.
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., ... Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 8367846.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & metabolism*, 9, 61.
- Alissandrakis, E., Kibaris, A., Tarantilis, P., Harizanis, P., Polissiou, M. (2005). Flavor compounds of Greek cotton honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1444 - 1452.
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 3(3), 420–432.
- Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of medicinal food*, 16(1), 42–47.
- Aparna, A.R. & Rajalakshmi, D. (1999). Honey—its characteristics, sensory aspects, and applications. *Food Reviews International*, 15(4), 455-471
- Carter, D. A., Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Bouzo, D., Brooks, P., Schothauer, R., & Harry, E. J. (2016). Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative. *Frontiers in microbiology*, 7, 569.
- Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., & Cleator, G.M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods*, 53, 25-36.

- Cavalli, R., Donalizio, M., Bisazza, A., Civra, A., Ranucci, E., Ferruti, P., & Lembo, D. (2012). Enhanced Antiviral Activity of Acyclovir Loaded into Nanoparticles. *Methods in Enzymology*, 509, 1-19.
- Chen, C. (2019). Relationship between Water Activity and Moisture Content in Floral Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(1), 30.
- Cherry, D. J., Krogstad, P. (2011). Enterovirus and Parechovirus Infections. In J. Remington (Ed.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. (7th ed., pp. 756-799), Philadelphia, U.S.A.: Elsevier
- Crane, E. (1999). *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. New York, USA: Routledge, p.21
- Ediriweera, E. R., & Premarathna, N. Y. (2012). Medicinal and cosmetic uses of Bee's Honey - A review. *Ayu*, 33(2), 178–182.
- Eleftheriou, E., Tsiripidis, I., Karabournioti, S. (2009). Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys. *Journal of Apicultural Research*, 48(2), 104-114.
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(6), 731–742.
- Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi journal of biological sciences*, 25(6), 1056–1065.
- Gullberg, M., Tolf, C., Jonsson, N., Mulders, M. N., Savolainen-Kopra, C., Hovi, T., ... Lindberg, A. M. (2010). Characterization of a putative ancestor of coxsackievirus B5. *Journal of virology*, 84(19), 9695–9708.
- Henquell, C., Mirand, A., Richter, J., Schuffenecker, I., Böttiger, B., Diedrich, S., ... Bailly, J. L. (2013). Phylogenetic patterns of human coxsackievirus B5 arise from population dynamics between two genogroups and reveal evolutionary factors of molecular adaptation and transmission. *Journal of virology*, 87(22), 12249–12259.
- Hu, Y. F., Zhao, R., Xue, Y., Yang, F., & Jin, Q. (2012). Full genome sequence of a novel coxsackievirus B5 strain isolated from neurological hand, foot, and mouth disease patients in China. *Journal of virology*, 86(20), 11408–11409.

- Imtara, H., Kmail, A., Touzani, S., Khader, M., Hamarshi, H., Saad, B., Lyoussi, B. (2019). Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in Morocco and Palestine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(87).
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS microbiology*, 4(4), 655–664.
- Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Karabournioti, S., Kontakos, S., Papastephanou, C., & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics. *Food chemistry*, 217, 445–455.
- Linford, J. (2018). *The Seven Culinary Wonders of the World: A History of Honey, Salt, Chile, Pork, Rice, Cacao, and Tomato*. London, UK: White Lion Publishing, p.62
- Machado De-Melo, A.A., Almeida-Muradian, L.B., Sancho, M.T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(2), 154–160.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., & Clarke, A. M. (2011). Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International journal of molecular sciences*, 12(12), 9514–9532.
- Marin-Garcia, J. (2007). CHAPTER 14 - Heart Response to Inflammation and Infection. In *Post-Genomic Cardiology* (pp. 415-437), London, UK: Elsevier
- Minden-Birkenmaier, B. A., & Bowlin, G. L. (2018). Honey-Based Templates in Wound Healing and Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 5(2), 46.
- Minden-Birkenmaier, B. A., Cherukuri, K., Smith, R. A., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2019). Manuka Honey Modulates the Inflammatory Behavior of a dHL-

60 Neutrophil Model under the Cytotoxic Limit. *International journal of biomaterials*, 2019(11), 1-12

- Monpoeho, S., Dehee, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.C., Billaudel, S., & Ferre, V. (2000). Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 29, 88–93.
- Muhammad, A. (2012). Acacia Honey Modulates Cell Cycle Progression, Pro-inflammatory Cytokines and Calcium Ions Secretion in PC-3 Cell Line. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 4(12)
- Oddo, L. P., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkvliet, J., Martin, P., Morlot, M., Valbuena, A. O., Ruoff, K., & Von der Ohe, K. (2004a). Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie*, 35(Suppl.1), S82-S93.
- Oddo, L. P., Piro, R., Flamini, C., Lheritier, J., Russmann, H., Ohe, W., Gotsiou, P., Karabournioti, S., Kefalas, P., Passaloglou-Katrali, M., Thrasyvoulou, A., Marcazzan, G., Piana, M., Piazza, M., Bentabol, A., Bogdanov, S. (2004b). Main European Unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl.1), S38-S81
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*, 7(3), 159–165.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A. (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *J Tissue Viability*, 25(2), 98–118.
- Portokalakis, I., Mohd Yusof, H.I., Ghanotakis, D.F., Nigam, P. S., Owusu-Apenten, R. (2016). Manuka Honey-induced Cytotoxicity against MCF7 Breast Cancer Cells is Correlated to Total Phenol Content and Antioxidant Power. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 8(2), 1-10.
- Pritchett, J.,C., Naesens, L., & Montoya, J. (2014). Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In L.Flamand, I. Lautenschlager, G.R.F. Krueger & D.V. Ablashi (Eds.), *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. p. 311-331.
- Sadeghi-Aliabadi, H., Hamzeh, J., & Mirian, M. (2015). Investigation of Astragalus honey and propolis extract's cytotoxic effect on two human cancer

cell lines and their oncogen and proapoptotic gene expression profiles. *Advanced biomedical research*, 4(42).

- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121–127.
- Shahzad, A., & Cohrs, R. J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Translational biomedicine*, 3(2), 2.
- Shojaii, A., & Abdollahi Fard, M. (2012). Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of Pimpinella anisum. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 510795.
- Sin, J., Mangale, V., Thienphrapa, W., Gottlieb, R. A., & Feuer, R. (2015). Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology*, 484, 288–304.
- Thrasyvoulou, A. & Manikis, J. (1995). Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6), 441-452
- Tsakogiannis, D., Kyriakopoulou, Z., Ruether, I.G.A., Amoutzias, G.D., Dimitriou, T.G., Diamantidou, V., Kotsovassilis, C., & Markoulatos, P. (2014). Determination of human papillomavirus 16 physical status through E1/E6 and E2/E6 ratio analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 63(12), 1716-1723.
- Tsigouri, A., Passaloglou-Katrali, M., Sabatakou, O. (2004). Palynological characteristics of different unifloral honeys from Greece. *Grana*, 43(2), 122-128
- Valestra, P. K., Fornos, S. H., Gian, J., & Cunha, B. A. (2016). Coxsackie B5 infection in an adult with fever, truncal rash, diarrhea and splenomegaly with highly elevated ferritin levels. *IDCases*, 6, 14–16.
- Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., & Kobayashi, N. (2014). Anti-influenza viral effects of honey in vitro: potent high activity of manuka honey. *Archives of medical research*, 45(5), 359–365.
- Yijin, Y., Yongjun, X., Guangqiang W., Hui Z., Zhiqiang, X., Jianshen, Yu, Haiyan, Y., Lianzhong, A. (2017). Comparison of oenological property, volatile profile, and sensory characteristic of Chinese rice wine fermented by different starters during brewing. *International Journal of Food Properties*, 20(4), S3195-S3211.

- Zumla, A., & Lulat, A. (1989). Honey--a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(7), 384–385.
- Παναγοπούλου, Β. (2018). Σχέσεις σεβασμού. *Εφημ. Των Συντακτών*
- Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη, Σ., Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. *1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας*, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου 2002
- Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (2001). *Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 2001, για το μέλι.*

Πηγές εικόνων

- **Εικόνα 1.2.1.1:** Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121–127.
- **Εικόνα 1.2.1.2:** Trujillo-Toledo, L., Martínez, D., Cruz, E., Rivera-Intriago, L., Nuñez, J., Pais Chanfrau, J. (2018). CHAPTER 26 - Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. In *Enzymes in Food Biotechnology*, London, UK: Elsevier
- **Εικόνα 1.2.3.1:** Colak, O., Yaşar, A., Cete, S., & Arslan, F. (2012). Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly(vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 40(5), 354–361.
- **Εικόνα 1.3.2.1, Εικόνα 1.6.2:** Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 3(3), 420–432.
- **Εικόνα 1.3.2.2:** Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., ... Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant

Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 8367846.

- **Εικόνα 1.3.6.1:** Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A. (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *J Tissue Viability*, 25(2), 98–118.
- **Εικόνα 1.7.1:** Yee, P. T., & Poh, C. L. (2015). Development of Novel Vaccines against Enterovirus-71. *Viruses*, 8(1), 1