



Działanie przeciwwirusowe produktu Camelyn (ekstraktu z miodu) w stosunku do wirusa SARS-CoV-2

Lilija Kalediene¹, Mariana Baz², Aura Liubaviciute^{3,4}, Gene Bizileviciene⁴, Ingrida Grabauskyte⁵, Ruta Bieliauskiene⁶, Paulius Jovaisas⁶, Nidas Jurjonas^{7,*}

¹Department of Microbiology and Biotechnology of Life Sciences Centre of Vilnius University, Litwa.

²Research Center in Infectious Diseases, CHU of Quebec-Laval University, Quebec City, QC, Kanada

³Pharmacy Center, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Vilnius, Litwa.

⁴Department of Biomodels of State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Vilnius, Litwa.

⁵Department of Physics, Mathematics and Biophysics of Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Litwa.

⁶UAB „Silicio Biotechnologijos”, Wilno, Litwa.

⁷UAB „Guruma”, Kaunas, Litwa.

*Korespondencję należy kierować na adres:

Nidas Jurjonas

UAB „Guruma”, Kaunas,

Litwa, nr telefonu: +370-37-328-877

e-mail: nidas.jurjonas@guruma.eu

Redaktor naukowy

Md Jamal Uddin, PhD

Ewha Womans University, Seoul,

Korea Południowa.

Informacje o artykule

Otrzymano: 27 kwietnia 2021 r.

Przyjęto: 01 czerwca 2021 r.

Opublikowano: niedziela, 6 czerwca

2021 r.

Słowa kluczowe:

działanie przeciwwirusowe; Camelyn; po czym przedstawiono wyniki w postaci wykresu w odniesieniu do stężeń środka cytotoksyczność; miód; SARS-CoV-2.

STRESZCZENIE

Celem tego badania była ocena potencjalnego działania przeciwwirusowego ekstraktu z miodu o nazwie „Camelyn” przeciwko koronawirusowi 2 powodującemu zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS-CoV-2). W teście cytotoxyczności produktu Camelyn użyto linii komórkowej z nerki noworodka chomika (BHK-21), hematopoetycznych komórek pnia (HSC) pochodzących ze szpiku kostnego oraz komórek śledziony. Po przeprowadzeniu procedur izolacji żywotność komórek oceniano po wybarwieniu błękitem trypanu pod mikroskopem przy użyciu hemocytometru. Tempo proliferacji komórek in vitro oceniano za pomocą testu CCK-8 (ang.: Cell Counting Kit 8). Komórki wysiewano na podłoża wzrostowe o różnych stężeniach produktu Camelyn (35 µg, 50 µg, 70 µg, 100 µg, 150 µg, i 200 µg). Za pomocą czytnika wielopłytkowego oznaczano absorbancję przy długości fali 450 nm. W celu ustalenia wrażliwości wirusa SARS-CoV-2 na lek działanie przeciwwirusowe oceniono za pomocą testu redukcji łyseinek. Seryjne rozcieńczenia wybranych związków wstępnie preinkubowano z 40 do 100 jednostek tworzących łyseinki (PFU) wirusa SARS-CoV-2. Mieszaninę produktu Camelyn i wirusa SARS-CoV-2 po preinkubacji dodawano następnie do komórek Vero E6 tworzących zlewającą się warstwę. Po inkubacji komórki utrwalano i barwiono, a następnie liczono PFU pod mikroskopem odwróconym, po czym przedstawiono wyniki w postaci wykresu w odniesieniu do stężeń środka przeciwwirusowego przedstawionych w postaci logarytmicznej. Nasze badanie wykazało, że produkt Camelyn nie jest cytotoxyczny, ma działanie pobudzające proliferację komórek oraz działa hamująco na wirus SARS-CoV-2, przy czym wartość EC50 (półmaksymalne stężenie skuteczne) wynosiła od 85,7 µg/ml do 192,4 µg/ml, w zależności od stężenia produktu i łyseinki wirusowej na komórkę.

WPROWADZENIE

W związku z obecną pandemią istnieje ogromne zapotrzebowanie na wszelkie możliwe metody leczenia i profilaktyki skierowane przeciwko chorobie COVID-19, w tym na istniejące produkty naturalne. Różne związki organiczne, w tym miód pszczele, propolis, mleczko pszczele, kurkumina, resweratrol, są szeroko badane i wykorzystywane jako potencjalne opcje terapeutyczne w leczeniu różnych zakażeń [1]. Pomimo krytyki nowoczesnej medycyny w ostatnich latach, miód zyskał duże zainteresowanie ze względu na szeroki zakres właściwości terapeutycznych, w tym działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwwirusowe [2, 3]. Badacze opisywali różne czynniki fitochemiczne, takie jak nadtlenek wodoru, lotne kwasy organiczne, lizozym, oksydazę glukozową i katalazę jako skuteczne czynniki przeciwbakteryjne [4]. Wosk pszczele, pyłek i propolis to ważne związki chemiczne, które odpowiadają za właściwości przeciwdrobnoustrojowe miodu [5, 6]. Miód zawiera również niewielkie ilości oligosacharydów hamujących wzrost różnych drobnoustrojów, takich jak bakterie jelitowe [7]. Obecne w miodzie, propolisie i mleczku pszczelim związki fenolowe, w tym flawonoidy, należą do związków biologicznie czynnych, wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe [8, 9]. Te czynniki fizyczne i chemiczne nadają miodowi wyjątkowe właściwości. Ustalono, że miód eliminuje zakażenia ran, ogranicza bliznowacenie, hamuje stan zapalny oraz stymuluje angiogenezę i wzrost nabłonka [10]. Wykazano, że działanie przeciwzapalne miodu wiąże się z zahamowaniem ekspresji cytokin [11]. Wiadomo, że miód może wzmacniać proliferację limfocytów T i B, a ponadto stymuluje fagocytozę i reguluje produkcję cytokin przez monocyty, takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF),

interleukina 1 beta (IL-1 β) i IL-6 [12]. Ustalono, że miód i kilka jego składników blokują cykl komórkowy linii komórek raka jelita grubego w fazie G0/G1 [13, 14].

Badania *in vitro* wykazały działanie przeciwwirusowe miodu w stosunku do różnych typów wirusów [15-17]. Działanie przeciwwirusowe miodu przypisuje się różnym jego składnikom, na przykład miedzi, która należy do pierwiastków śladowych zawartych w miodzie i posiada zdolność inaktywacji wirusów. Związki fenolowe (takie jak flawonoidy), kwas askorbinowy lub nadtlenek wodoru, hamują wzrost wirusów zakłócając transkrypcję, translację i replikację wirusa [1], [18], [19]. W celu wyjaśnienia możliwego działania miodu, w badaniu Watanabe i wsp. [20] wykorzystano testy redukcji łysinek wirusowych. Według dostępnych doniesień miód manuka skutecznie hamuje replikację wirusa grypy (EC50 = 3,6 \pm 1,2 mg/ml), co wiąże się z jego działaniem przeciwwirusowym. W obecności miodu manuka w stężeniu 3,13 mg/ml wartość EC50 dla zanamiwirusu lub oseltamiwirusu spadła do niemal 1/1000 tej wartości dla jednorazowego podania tych leków. Wyniki wykazały, że miód wykazuje silne działanie hamujące na wirus grypy, jak również wykazały możliwą wartość leczniczą miodu.

Analizowano różne rodzaje miodu z ośmiu źródeł kwiatowych w celu oceny ich działania przeciwko wirusowi HIV-1, jak również ich wpływu na proliferację limfocytów. W ocenie aktywności anti-HIV-1 ośmiu różnych rodzajów miodu wykorzystano ilościową metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Badanie wykazało, że miody jednokwiatowe (pochodzące z tych samych gatunków roślin) charakteryzowały się aktywnością anti-HIV-1 zależną od źródeł roślinnych i ilości metylogliksalu w biomacie tych roślin [21].

Badanie Abedi i wsp. [22] dostarczyło pewnych dowodów na potencjalne działanie miodu i zawartych w nim związków na koronawirusy ze względu na ich zdolność do regulowania przyłączania i wnikania wirusa do komórek gospodarza oraz replikacji jego RNA. Miód i jego składniki mogą również regulować komórkowe szlaki sygnalizacyjne, w tym stres oksydacyjny, procesy zapalne i apoptozę. Jednym z mechanizmów działania przeciwwirusowego jest hamowanie białek wirusowych niezbędnych do przyłgnięcia i wniknięcia wirusa do komórki gospodarza [23]. Podkreślono, że miód może wpływać na wiązania dwusiarczkowe receptorów hemaglutyniny (HA), co zapobiega wiązaniu się wirusa grypy z powierzchnią komórek gospodarza. Białko kolca koronawirusa należy do tej samej klasy białek [24]. Według dostępnych doniesień [25,26] związki obecne w miodzie, takie jak kwercetyna, chryzyna, kemferol, galangina i kwas kawowy, wykazują działanie przeciwwirusowe w stosunku do wirusa COVID-19 dzięki wiązaniu o silnym powinowactwie z główną proteazą i [hamowaniu] replikacji wirusa. Główne związki zawarte w miodzie, takie jak kemferol, galangina i kwas kawowy, mogą hamować adsorpcję, inwazję i replikację wirusów. Chryzyna może zapobiegać wnikaniu wirusów do komórek gospodarza i ich replikacji. Kwercetyna może hamować opłaszczanie, inwazję i replikację wirusa [27-29]. Ostatnie badania i artykuł przeglądowy dotyczące potencjalnych działań farmakologicznych miodu [30] wskazują, że miód i jego główne składniki mogą znaleźć zastosowanie w zapobieganiu zakażeniu koronawirusowym i w ich leczeniu, co dotyczy także choroby COVID-19.

Chociaż działanie przeciwdrobnoustrojowe miodu zostało dobrze zbadane w odniesieniu do wielu bakterii i grzybów [31] [32], jego działania przeciwwirusowe nadal wymagają szeroko zakrojonych badań, aby można było go stosować w profilaktyce i leczeniu różnych zakażeń wirusowych. Celem tego badania była ocena działania przeciwwirusowego ekstraktu z miodu o nazwie „Camelyn” przeciwko koronawirusowi 2 powodującemu zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS-CoV-2).

MATERIAŁ I METODYKA

Produkt komercyjny Camelyn w ampułkach, uzyskany od spółki JSC „Silicon Biotechnology”, wytwarzany jest z wyselekcjonowanego ekstraktu z miodu. Zawartość ampułki składa się w 35% z produktu Camelyn i w 65% z wody do wstrzykiwań. Produkt Camelyn zawiera ketony, etery, kwasy bioorganiczne, fenole, aldehydy i furfural. Do testów cytotoksyczności i działania przeciwwirusowego produkt Camelyn rozcieńczano do stężenia końcowego od 10 μ g/ml do 2500 μ g/ml.

Zwierzęta eksperymentalne

Sześciotygodniowe myszy BALB/c (n=3) hodowano i trzymano w zakładzie hodowlanym w Państwowym Instytucie Badawczym Medycyny Innowacyjnej (ang.: State Research Institute Centre for Innovative Medicine) (Litwa). Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi instytucjonalnymi Unii Europejskiej i zostały zatwierdzone przez Litewską Komisję Etyczną ds. Wykorzystywania Zwierząt Laboracyjnych podległą Państwowej Służbie Weterynaryjnej, nr uchwały G2-124 (2019.07.11). Zwierzęta utrzymywano w środowisku o kontrolowanej temperaturze (23 \pm 1°C). Zapewniano karmę i wodę *ad libitum*.

Przygotowanie komórek

Linie komórkową z nerki noworodka chomika (BHK-21) otrzymano z Centrum Nauk o Życiu Uniwersytetu Wileńskiego (Vilnius University Life Sciences Center) (Litwa). Macierzyste komórki BHK-21 wysiewano na pożywkę Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) o wysokim stężeniu glukozy (4,5 g/l) (Life Technologies, USA) zawierającą 10% FBS (Lonza, Szwajcaria) i 1% antybiotyków (penicylina i streptomycyna 10 000 U) (Lonza, Szwajcaria). Hodowle utrzymywano w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO₂. Monowarstwę komórek poddawano dyspersji przy użyciu mieszaniny o składzie 0,25% trypsyna – EDTA (Lonza, Szwajcaria).

Macierzyste komórki hematopoetyczne pochodzące ze szpiku kostnego (HSC) izolowano poprzez przepłukiwanie kości udowych i kości piszczelowych myszy BALB/c, według metodologii przedstawionej uprzednio w publikacji Jupperi i wsp. [33] z pewnymi modyfikacjami. Komórki śledzionowe izolowano przez rozwarstwianie tkanek pod niskim ciśnieniem za pomocą PBS, a następnie przepuszczano przez sterylny filtr komórkowy o średnicy porów 70 μ m. Zawiesiny pobranych

HSC i komórek śledzionowych przemywano PBS, a następnie frakcjonowano w gradiencie gęstości przy użyciu podłoża Lympholyte M (Cedarlane, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Wyizolowane HSC i komórki śledziony trzykrotnie przemywano roztworem RPMI-1640 zawierającym 10% FBS (Lonza, Szwajcaria) i 1% antybiotyków (penicylina i streptomycyna 10 000 U (Lonza, Szwajcaria), odwirowywano przez 10 minut z przyspieszeniem 300 x g, ponownie zawieszano i zliczano. Po przeprowadzeniu procedur izolacji żywotność komórek oceniano przy pomocy barwienia błękitem trypanu (0,4%, w/v) pod mikroskopem Nikon ECLIPSE 50i (Nikon, Japonia) przy użyciu hemocytometru.

Test cytotoksyczności produktu Camelyn

Wskaźnik proliferacji komórek *in vitro* oznaczano przy użyciu zestawu do liczenia komórek CCK-8 (Dojindo Laboratories, Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. 2 x 10⁵ komórek BHK-21 i HSC oraz 5

x 10⁵ komórek śledziony wysiewano na podłoże wzrostowe umieszczone na 96-dołkowych płytkach i przez 72 godziny inkubowano z roztworem kontrolnym oraz roztworami produktu Camelyn o różnych stężeniach (35 µg, 50 µg, 70 µg, 100 µg, 150 µg i 200 µg) w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Za pomocą czytnika wielopłytkowego Sunrise (Tecan, Austria) oznaczano absorbancję przy długości fali 450 nm. Żywotność komórek poddanych działaniu produktu Camelyn porównano z komórkami kontrolnymi (niepoddanymi żadnemu działaniu) i poddanymi działaniu DMSO (kontrola pozytywna). Wszystkie testy przeprowadzono w trzech niezależnych eksperymentach.

Test redukcji łysinek dla wirusa SARS-CoV-2

W celu ustalenia wrażliwości wirusa SARS-CoV-2 (Quebec City/21697/2020) na lek przeprowadzono test redukcji łysinek. Wybrane związki oceniano w teście redukcji łysinek, który jest metodą fenotypową stanowiącą złoty standard w ocenie wrażliwości wirusa SARS-CoV-2 na leki. W skrócie, do 6 płytek dołkowych wysiano komórki Vero E6 w stadium zlewającej się warstwy, w ilości po 1 x 10⁵ komórek na dołek. Seryjne rozcieńczenia wybranych związków poddano preinkubacji z 40 do 100 jednostek tworzących łysinki (PFU) wirusa SARS-CoV-2 przez 60 minut w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Następnie mieszaninę danego związku i wirusa SARS-CoV-2 po preinkubacji dodawano do komórek Vero E6 i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Następnie usuwano inokulum, a zakażone komórki inkubowano przez trzy dni (bez danego związku) w pożywce minimalnej (Minimum Essential Medium; MEM) (Merck, Niemcy) z 2% płodową surowicą bydlęcą (Thermo Fisher Scientific, USA) zawierającą 0,6% agarozy SeaPlaque (Lonza, Szwajcaria). Komórki utrwalano i barwiono, a następnie zliczano PFU pod mikroskopem odwróconym, po czym wynik przedstawiano w postaci wykresu w odniesieniu do logarytmu stężeń przeciwwirusowych. Następnie obliczano wartości EC50. Równolegle, według standardowego protokołu (bez preinkubacji wirusa z lekami) przeprowadzono test redukcji łysinek dla leków przeciwwirusowych flawipirawiru i remdesiwiru, w celu ustalenia wrażliwości wirusa SARS-CoV-2 na te leki.

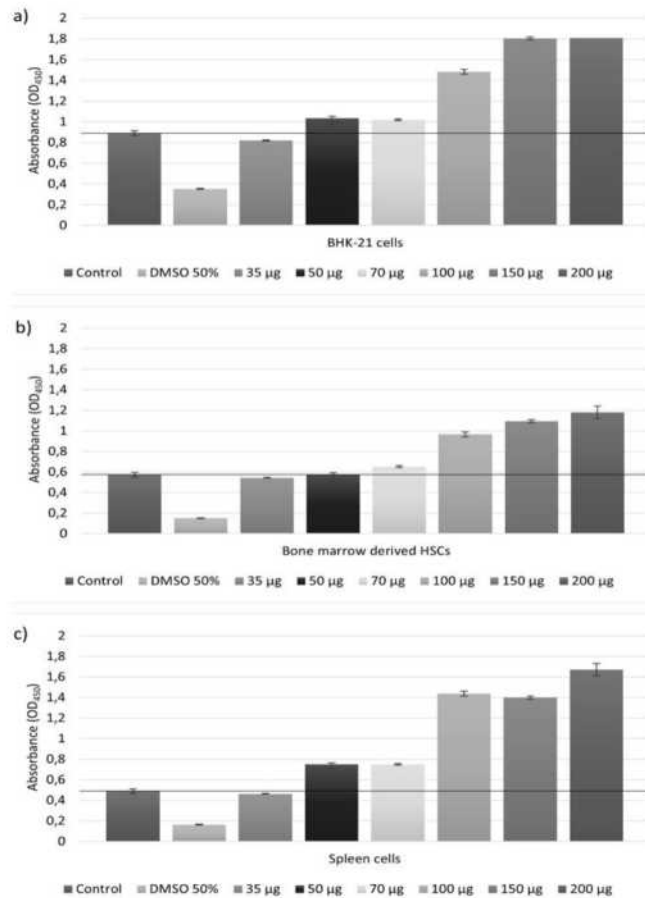
Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programów Microsoft Excel i IBM SPSS Statistics 25. Do obliczania zależności pomiędzy zmiennymi użyto korelacji rang Spearmana. Za statystycznie znamienne przyjęto poziom prawdopodobieństwa – wartość P < 0,05.

WYNIKI

Test cytotoksyczności

Test cytotoksyczności to ilościowe oznaczenie różnicy między wskaźnikami śmierci i proliferacji komórek, który został wykorzystany w naszych doświadczeniach do oceny ewentualnego wpływu badanego produktu miodopochodnego na wzrost i proliferację komórek. Każda ampulka produktu Camelyn (ekstraktu z miodu) zawierała 2 ml roztworu do wstrzykiwań koloru bursztynowego. Zawartość związków aktywnych wynosiła 0,035 g/ml. Żadne z badanych stężeń produktu Camelyn (35 µg, 50 µg, 70 µg, 100 µg, 150 µg i 200 µg) nie wykazywało szkodliwego działania cytotoksycznego (Rycina 1a, 1b, 1c). Wyższe stężenia produktu Camelyn znamienne zwiększały liczbę hematopoetycznych komórek pnia. W porównaniu z próbą kontrolną, liczba HSC wahała się od 114%, przy stężeniu produktu Camelyn 70 µg/ml, do 206%, gdy stężenie produktu osiągnęło 200 µg/ml. Podobne tendencje zaobserwowano w teście dotyczącym linii komórkowej BKH-21 (Rycina 1a, 1b). Liczba komórek wzrastała od 116% do 203%, gdy stężenie produktu rosło od 70 µg/ml do 200 µg/ml. Działanie stymulujące produktu Camelyn był jeszcze bardziej zauważalne w odniesieniu do wzrostu komórek śledziony. Nasilenie proliferacji komórek śledziony rozpoczynało się przy stężeniu produktu Camelyn wynoszącym 50 µg/ml, a na zakończenie eksperymentu średnia liczba komórek poddanych działaniu produktu była ponad trzykrotnie wyższa niż w próbie kontrolnej (Rycina 1c.).

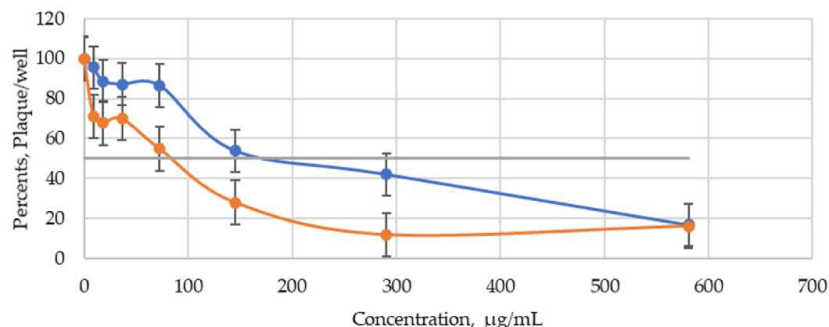


Rycina 1. Wpływ różnych stężeń produktu Camelyn (ekstraktu z miodu) na wzrost komórek nerkowych noworodka chomika linii 21 (BHK-21) (a), hematopoetycznych komórek pnia (HSC) (b) i komórek śledziony (c); czarna linia pozioma – wartość kontrolnej gęstości optycznej (OD).

Test redukcji łysinek dla wirusa SARS-CoV-2

W celu oceny działania przeciwwirusowego produktu Camelyn w stosunku do wirusa SARS-CoV-2, ustalono jego półmaksymalne stężenie skuteczne (EC₅₀). Komórki Vero E6 w stadium zlewnym wysiano na 6-dołkowych płytkach. Dwukrotne seryjne rozcieńczenia produktu Camelyn preinkubowano z około 50-100 jednostkami tworzącymi łysinki (PFU) wirusa SARS-CoV-2 (Quebec City/21697/2020) przez 60 minut, a następnie wykorzystano do infekowania komórek. Po 3 dniach inkubacji (bez produktu Camelyn) komórki utrwalano i barwiono fioletem krystalicznym. PFU zliczano pod mikroskopem odwróconym, a uzyskany wynik przedstawiano w postaci wykresu w odniesieniu do logarytmu stężeń produktu przeciwwirusowego, co pozwalało na ustalenie wartości EC₅₀.

Stężenia produktu Camelyn (ekstraktu z miodu) w przedziale od 9,08 µg/ml do 72,6 µg/ml wykazywały nieznamienisty wpływ na redukcję łysinek wirusowych w przypadku zakażenia komórek za pomocą 100 PFU. Liczba łysinek wirusowych obniżała się o 4,5–13,5%. Wyższe stężenie, wynoszące 145,3 µg/ml obniżało liczbę łysinek wirusowych do 53,85% (Rycina 2). Wartość EC₅₀ wyniosła 192,4 µg/ml.



Rycina 2. Wpływ różnych stężeń produktu Camelyn na redukcję łysinek wirusowych spowodowanych przez wirus SARS-CoV-2 w komórkach VERO E6: niebieska linia – średnia liczba łysinek wirusowych na dołek wyniosła 100 (korelacja rang Spearmana między liczbą łysinek wirusowych na dołek a stężeniem wyniosła $r_{s1} = -1,000$ i była znamienna na poziomie 0,01 (w teście 2-stronnym)); czerwona linia – średnia liczba łysinek wirusowych na dołek wyniosła 30 (korelacja rang Spearmana między liczbą łysinek wirusowych na dołek a stężeniem wyniosła $r_{s1} = -0,952$ i była znamienna na poziomie 0,01 (w teście 2-stronnym)); szara linia – półmaksymalne stężenie skuteczne (EC₅₀).

Po obniżeniu inokulum wirusowego do 25-30 PFU produkt Camelyn w stężeniach w przedziale od 9,08 µg/ml do 36,3 µg/ml obniżał liczbę łysinek wirusowych o 30-33% (Rycina 2). Począwszy od stężenia 72,6 µg/ml, liczba łysinek wirusowych obniżała się znacząco w porównaniu z próbą kontrolną. Ten test wykazał, że produkt Camelyn (ekstrakt z miodu) wykazuje działanie hamujące, przy czym wartość EC50 wynosi 85,7 µg/ml. Dodatkowy test wykonano przy użyciu produktu stężonego, tabletek Camelyn, w celu sprawdzenia podobieństwa profilu hamowania. Po zastosowaniu produktu Camelyn w tabletkach uzyskano podobny wpływ hamujący na liczbę łysinek wirusowych. Jednakże rozcieńczenia stężonego roztworu tabletek Camelyn wykazały silniejszy efekt hamujący, z wartością EC50 wynoszącą $116,27 \pm 73,39$ µg/ml po użyciu do zainfekowania 100 PFU wirusa. Nasze wyniki wykazały, że ekstrakt Camelyn prawdopodobnie wywiera działanie hamujące na początku cyklu replikacyjnego wirusa SARS-CoV-2.

Dla porównania stwierdzono, że wartości EC50 dla leków przeciwwirusowych fawipirawiru i remdesiwiru wynoszą, odpowiednio, 15,71 µg/ml (100 µM) i 0,616 µg/ml (1,16 µM). Wang i wsp. [34] stwierdzili, że fawipirawir wykazuje *in vitro* aktywność przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, aczkolwiek konieczne jest tu wysokie stężenie leku w porównaniu z remdesiwirem (EC50 = 61,80 µM). Należy zwrócić uwagę, że remdesiwir silnie blokował zakażenie wirusowe przy niskim stężeniu mikromolarnym (EC50 = 0.77 µM) [35].

OMÓWIENIE

Miód, znany ze swoich korzystnych właściwości leczniczych, cieszy się zainteresowaniem jako lek naturalny. Coraz więcej doniesień naukowych i klinicznych sugeruje, że miód można stosować nie tylko w kuracjach domowych, ale również w leczeniu ran i naprawie tkanek [36], [37], [38]. Korzystny wpływ miodu na gojenie ran przypisywano głównie jego działaniu przeciwbakteryjnemu. Wysoka zawartość cukru zapewniająca wysokie ciśnienie osmotyczne oraz niska wartość pH powodują odwodnienie komórek bakteryjnych i przerwanie ściany komórkowej. Badania wykazują, że działania przeciwdrobnoustrojowe miodu związane są ze wzrostem aktywności nadtlenu wodoru należącego do reaktywnych form tlenu (ROS) [39]. Działanie antyoksydacyjne miodu koreluje z jego działaniem przeciwzapalnym i korzystnym wpływem na gojenie się ran [40].

Próbki miodu mogą uwalniać nadtlenek wodoru, który jest wytwarzany przez enzym oksydazę glukozową i który jest odpowiedzialny za działanie przeciwdrobnoustrojowe [39]. Szkodliwego działania utleniającego nadtlenu wodoru nie obserwuje się w komórkach skóry ze względu na polifenole wchodzące w skład miodu, które mogą przeciwdziałać działaniu tego związku z grupy ROS. Niektórzy badacze odnotowali zdolność miodu do indukcji proliferacji komórek pnia, pobudzania migracji hematopoetycznych komórek pnia, a także do pośredniczenia w procesach gojenia poprzez zwiększenie przepływu krwi w tkankach. Z drugiej strony miód wykazywał hamujący wpływ na wzrost komórek poprzez ograniczenie ich zdolności do proliferacji, indukcję apoptozy komórek i hamowanie cyklu komórkowego w sposób zależny od dawki [41].

W wielu przypadkach miód powinien być stosowany w jego naturalnej formie. Jednakże, w razie potrzeby, aktywne składniki miodu, takie jak małe peptydy, aminokwasy, polifenole, cukry czy witaminy, można z miodu ekstrahować. Camelyn to oryginalny ekstrakt z miodu, otrzymywany ze specjalnego rodzaju miodu opatentowaną metodą ekstrakcji, który jest mieszaniną cukrów, białek, polifenoli, witamin, minerałów i wolnych aminokwasów. Uzyskane dane wskazują, że produkt Camelyn nie jest cytotoksyczny i ma silny wpływ pobudzający na proliferację komórek. Ze względu na tę właściwość produkt Camelyn byłby przydatny w gojeniu ran jako kolejny produkt miodopochodny.

Dane pochodzące z badania klinicznego przeprowadzonego przez [Bakradze](#) i wsp., dotyczącego chorób zapalnych przyzębia wskazują, że produkt Camelyn posiada właściwości immunostymulujące i przeciwzapalne, aktywuje procesy regeneracji oraz ma działanie przeciwbólowe. Obserwacją kliniczną objęto 56 pacjentów z różnymi postaciami choroby (zapalenie dziąseł, zapalenie przyzębia). Wyniki badania potwierdziły zasadność kliniczną stosowania produktu Camelyn w leczeniu skojarzonym zapalenia dziąseł i zapalenia przyzębia [42]. Badania Chumburidze i wsp. [43] wykazały doskonałe działanie regenerujące i gojące produktu Camelyn na uszkodzone tkanki. W tym badaniu przedstawiono charakterystykę produktu Camelyn w leczeniu różnych rodzajów zakażeń i nowotworów oraz farmakokinetykę produktu Camelyn w osoczu szczurów. W badaniu Maglakelidze i wsp. ustalono minimalne stężenie hamujące (MIC) produktu Camelyn w odniesieniu do niektórych szczepów bakteryjnych i grzybiczych [44]. Stwierdzono, że produkt Camelyn wykazuje silne działanie hamujące (0,012–0,150 µg/ml) wobec większości badanych bakterii w badaniach *in vitro*. *In vitro* produkt Camelyn wykazywał silną aktywność przeciwko opornym na flukonazol szczepom *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* i *Candida krusei*, a wartość MIC dla zahamowania 90% izolatów wyniosła 0,012 µg/ml.

O ile wiadomo, w żadnym opublikowanym badaniu naukowym ani klinicznym nie zaobserwowano wpływu miodu na wirus SARS-CoV-2. Jak dotąd skuteczność miodu i zawartych w nim substancji czynnych u pacjentów z chorobą COVID-19 oceniana jest w czterech zarejestrowanych badaniach klinicznych (NCT04323345, NCT04345549, NCT04347382, NCT04468139) [45].

Przeprowadzono kilka badań, na podstawie których przewidywano powinowactwo związków polifenolowych obecnych w miodzie manuka do białek wirusa SARS-CoV-2. Większość z tych badań oceniała ewentualne działanie przeciwwirusowe polifenoli na podstawie przewidywanego wiązania z główną proteazą (Mpro) wirusa SARS-CoV-2 [28] [46]. Badanie Hashema [28] oceniało przesiewowo aktywność biologiczną sześciu związków obecnych w miodzie pszczelim i propolisie wobec wirusa COVID-19. Badanie wykazało, że cztery związki wiążą się z wirusem COVID-19 z wysokim powinowactwem i mogą hamować jego replikację. Do tych związków bioaktywnych należą polifenole, które aktualnie oceniane są w badaniach klinicznych fazy III w leczeniu pacjentów chorujących na chorobę COVID-19 [46]. Wyniki badania Watanabe i wsp. [20] wykazały, że miód, a w szczególności miód manuka, wykazuje silne działanie hamujące na wirus grypy, co wskazuje na jego potencjalną wartość leczniczą. Miód manuka skutecznie hamował replikację wirusa grypy (EC50 = $3,6 \pm 1,2$ mg/ml). W porównaniu z działaniem hamującym produktu Camelyn, stężenie to jest 10-20 razy wyższe.

Na podstawie przeglądu badań naukowych Hossain i wsp. [30] doszli do wniosku, że miód może być przydatny u pacjentów z chorobą COVID-19 poprzez kilka głównych mechanizmów: bezpośrednie właściwości przeciwwirusowe, regulację/wzmocnienie szlaków sygnalizacji immunologicznej gospodarza oraz leczenie i/lub łagodzenie schorzeń współistniejących. Stosowanie leków napotyka kilka problemów, takich jak wielolekowa oporność bakterii i możliwe działania niepożądane. To sprawia, że należy myśleć o nowych alternatywach terapeutycznych, takich jak miód i produkty miodopochodne.

WNIOSKI

Badanie wykazało, że ekstrakt z miodu, produkt Camelyn, nie wykazuje działania cytotoksycznego, jest bezpieczny i posiada właściwości przeciwwirusowe w odniesieniu do wirusa SARS-CoV-2. Jednakże w przyszłości konieczne są dalsze szczegółowe badania molekularne dotyczące wpływu produktu Camelyn na replikację wirusa lub układ odpornościowy. Nie ma wątpliwości, że produkt Camelyn nie działa w taki sam sposób jak inne badane leki stosowane obecnie w leczeniu choroby COVID 19, jednakże, biorąc pod uwagę obecną sytuację kryzysową spowodowaną pandemią COVID-19 i ograniczone możliwości terapeutyczne, Camelyn przedstawiany jest jako obiecująca i odpowiednia opcja terapeutyczna, która jest bezpieczna, łatwa do podawania doustnego i łatwo dostępna jako naturalny suplement.

WKŁAD POSZCZEGÓLNYCH AUTORÓW

Koncepcja, L.K.; metodologia, M.B., L.K. i G.B.; analiza formalna, I.G.; badania, M.B. i A.L.; pisanie artykułu – przygotowanie oryginalnej wersji roboczej, L.K.; pisanie artykułu – przegląd i redakcja, M.B, A.L., N.J.; wizualizacja, I.G.; nadzór, R.B.; pozyskanie finansowania, P. J. Wszyscy autorzy przeczytali i zaakceptowali opublikowaną wersję manuskryptu.

PODZIĘKOWANIA

Materiały wykorzystywane w eksperymentach zostały dostarczone przez spółkę JSC „Silicon Biotechnologia”. Badania te zostały sfinansowane przez Agencję Nauki, Innowacji i Technologii (ang.: the Agency for Science, Innovation and Technology) Republiki Litewskiej (MITA) (grant nr 01.2.1-MITA-T-851-02-0248 dla P.J.) oraz Kanadyjski Instytut Badań nad Zdrowiem (ang.: the Canadian Institutes of Health Research) (grant nr 170629 dla M.B.).

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

- [1] Ali AM, Kunugi H. Propolis, Bee Honey, and Their Components Protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review of In Silico, In Vitro, and Clinical Studies. *Molecules* 2021;26:1231. <https://doi.org/10.3390/molecules26051232>.
- [2] Molan P. Why honey is effective as a medicine: 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World* 2001;82:22–40. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099498>.
- [3] Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr J Health Sci* 2007;7:159–65.
- [4] Bansal V, Medhi B, Pandhi P. Honey - A remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2005;3:305–9.
- [5] Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol* 2008;46:3774–9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.062>.
- [6] Al-Hatamleh MAI, Boer JC, Wilson KI, Plebanski M, Mohamud R, Mustafa MZ. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules* 2020;10:1–28. <https://doi.org/10.3390/biom10060923>.
- [7] Shin HS, Ustunol Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison. *Food Research International* 2005;38:721–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.01.007>.
- [8] Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodríguez P, Manna PP, et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules* 2018;23:1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>.
- [9] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008;73:117–24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>.
- [10] Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Lower Extremity Wounds* 2006;5:40–54. <https://doi.org/10.1177/1534734605286014>.
- [11] Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML. Honey as a complementary medicine. *Integr Med Insights* 2017;12:1–15. <https://doi.org/10.1177/1178633717702869>.
- [12] Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 2003;21:242–7. [https://doi.org/10.1016/S1043-4666\(03\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S1043-4666(03)00092-9).
- [13] Jaganathan SK. Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. *J ApiProduct and ApiMed Sci* 2009;1:29–36. <https://doi.org/10.3896/ibra.4.01.2.02>.
- [14] Pichúchero E, Ciccori R, Matthey M, Muzi MG, Canini A. Acacia honey and chrysin reduce proliferation of melanoma cells through alterations in cell cycle progression. *Int J Oncol* 2010;37:973–81.
- [15] Shahzad A, Cohrs RJ. In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Transl Biomed* 2012;3:2.
- [16] Al-Waili NS. Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Med Sci Monit* 2004;10:94–9.
- [17] Berretta AA, Silveira MAID, Córdor Capcha JM, de Jong D. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Biomed Pharmacother* 2020;131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110622>.
- [18] Kwakman PHS, te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS ONE* 2011;6:3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709>.
- [19] Yao L, Jiang Y, Yang B, Singanusong R, Datta N, Caffin N, et al. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys. *J Agric Food Chem* 2004;52:210–4. <https://doi.org/10.1021/jf034990u>.
- [20] Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. *Arch Med Res* 2014;45:359–65. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.05.006>.
- [21] Behbahani M, Khan RL. Anti-HIV-1 Activity of Eight Monofloral Iranian Honey Types. *PLoS ONE* 2014;9:e108195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108195>.
- [22] Abedi F, Chasemi S, Farkhondch T, Azimi-Nezhad M, Shakibaei M, Samarghandian S. Possible Potential Effects of Honey and Its Main Components Against Covid-19 Infection. *Dose-Response* 2021;19:1–13. <https://doi.org/10.1177/1559325820982423>.
- [23] Münster K. Bee products and the treatment of blister-like lesions around the mouth, skin and genitalia caused by herpes viruses – A systematic review. *Complement Ther Med* 2019;43:81–4. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.01.014>.
- [24] Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses* 2012;4:1011–33. <https://doi.org/10.3390/v4061011>.

- [25] Anand K, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003;300:1763–7.
- [26] Hilgenfeld R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronavirus proteases enable antiviral drug design. *FEBS J* 2014;281:4085–96. <https://doi.org/10.1111/febs.12936>.
- [27] Choi HJ, Kim JH, Lee CH, Ahn YJ, Song JH, Baek SH, et al. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res* 2009;81:77–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.002>.
- [28] Hashem HE. *In Silico* Approach of Some Selected Honey Constituents as SARS-CoV-2 Main Protease (COVID-19) Inhibitors. *EJMO* 2020;4:196–200. <https://doi.org/10.14744/ejmo.2020.36102>.
- [29] Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Chauhan A. A flavonoid, luteolin, cripples HIV-1 by abrogation of Tat function. *PLoS ONE* 2011;6:e27915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027915>.
- [30] Hossain KS, Hossain MG, Moni A, Rahman MM, Rahman UH, Alam M, et al. Prospects of honey in fighting against COVID-19: pharmacological insights and therapeutic promises. *Heliyon* 2020;6:e05798. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05798>.
- [31] Israeli Z h. Antimicrobial properties of honey. *Am J Ther* 2014;21:304–23.
- [32] Albaridi NA. Antibacterial potency of honey. *Int J Microbiol* 2019;1:1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>.
- [33] Juopperi TA, Schuler W, Yuan X, Collector MI, Dang C v., Sharkis SJ. Isolation of bone marrow-derived stem cells using density-gradient separation. *Exp Hematol* 2007;35:335–41. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.09.014>.
- [34] Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*. *Cell Res* 2020;30:269–71. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
- [35] Coomes EA, Haghbayan H. Favipiravir, an antiviral for COVID-19? *J Antimicrob Chemother* 2020;75:2013–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa171>.
- [36] Saikaly SK, Khachemoune A. Honey and Wound Healing: An Update. *Am J Clin Dermatol* 2017;18:237–51. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0247-8>.
- [37] Martinotti S, Bucekova M, Juraj Majtan, Ranzato E. An Effective Regenerative Medicine Product in Wound Management. *Curr Med Chem* 2019;26:5230–40.
- [38] Martinotti S, Laforenza U, Patrone M, Moccia F, Ranzato E. Honey-mediated wound healing: H₂O₂ entry through AQP3 determines extracellular Ca²⁺ influx. *Int J of Mol Sci* 2019;20:764. <https://doi.org/10.3390/ijms20030764>.
- [39] Nooh HZ, Nour-Eldien NM. The dual anti-inflammatory and antioxidant activities of natural honey promote cell proliferation and neural regeneration in a rat model of colitis. *Acta Histochem* 2016;118:588–95. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.06.006>.
- [40] Manjunatha HD, Chua LS. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *Eur Food Res Technol* 2014;239:1003–14. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2297-6>.
- [41] Afrin S, Giampieri F, Gasparini M, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodríguez P, et al. The inhibitory effect of Manuka honey on human colon cancer HCT-116 and LoVo cell growth. Part 1: the suppression of cell proliferation, promotion of apoptosis and arrest of the cell cycle. *Food Funct* 2018. <https://doi.org/10.1039/c8fo00164b>.
- [42] Bakradze MS, Chantladze VG, Shoniia NO. Using Camelyn in stomatology, results and vistas. *Georgian Med News* 2009;171:24–7.
- [43] Chumburidze TB, Murtazashvili TG, Kunchulia LS, Nemsitsveridze NG. Analysis of pharmacokinetics of kamelin in rat's blood plasma. *Georgian Med News* 2009;167:96–8.
- [44] Maglakelidze B, Abasshidze G, Dedashidze I, Mshvildadze V, Pichete A. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antibacterial and antifungal activity of "CAMELYN M". *Science and Technology Against Microbial Pathogens. Proceedings of the International Conference on Antimicrobial Research*, 2011, p. 94–9.
- [45] Tantawy MA. The Efficacy of Natural Honey in Patients Infected with Novel Coronavirus (COVID-19): A Randomized, Controlled, Single Masked, Investigator Initiated, Multi-center Trial. 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04323345>.
- [46] Mustafa MZ, Shamsuddin SI, Sulaiman SA, Abdullah JM. Anti-inflammatory properties of stingless bee honey may reduce the severity of pulmonary manifestations in COVID-19 infections. *Malays J Med Sci* 2020;27:165–9. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.2.17>.

Jest to artykuł o otwartym dostępie, rozpowszechniany na warunkach licencji Creative Commons Attribution Non-Commercial License, który umożliwia nieograniczone niekomercyjne wykorzystanie, dystrybucję i powielanie na dowolnym nośniku, pod warunkiem odpowiedniego cytowania pracy oryginalnej.