

# Antimikrobni, antioksidativni i imunomodulacijski učinak tekućih ekstrakata propolisa

---

Rak, Jana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:543852>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**VETERINARSKI FAKULTET**

**JANA RAK**

**Antimikrobni, antioksidativni i imunomodulacijski učinak tekućih  
ekstrakata propolisa**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2020.**

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Jelene Šuran, te u Laboratoriju za naprednu genomiku, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Josipe Vlainić.

Predstojnica zavoda:

doc. dr. sc. Jelena Šuran

Mentorice:

doc. dr. sc. Jelena Šuran

dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Frane Božić
2. prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić
3. doc. dr. sc. Jelena Šuran
4. prof. dr. sc. Emil Srebočan (zamjena)

## **Zahvala**

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Jeleni Šuran na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada, ali i na podršci, dostupnosti, posvećenosti te ljubaznosti pri izradi istog. Zahvaljujem se i komentorici dr.sc. Josipi Vlainić na pruženom vodstvu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i cijelom Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta, kao i pristupačnim i ljubaznim djelatnicima Laboratorija za naprednu genomiku.

Veliko hvala mojim roditeljima i užoj obitelji, koji su me pratili, bodrili i bili najveći oslonac na putu stjecanja diplome. Posebice zahvaljujem mojoj majci, na pruženoj bezuvjetnoj ljubavi, bezbrojnim odricanjima te neopisivo velikoj potpori tijekom cijelog školovanja.

## **Popis kratica**

ATCC – engl. American Type Culture Collection (kolekcija sojeva američkog tipa)

BEP – bezalkoholni ekstrakt propolisa

CAPE – fenil ester kavene kiseline

CAT – katalaza

CFU – eng. colony-forming unit (jedinica za procjenu broja održivih bakterija ili gljivičnih stanica u uzorku)

CV – kristalviolet

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EEP – etanolni ekstrakt propolisa

FeCl<sub>3</sub> – željezov (III) klorid

FeSO<sub>4</sub> – željezov sulfat

FRAP – eng. frap-ferric reducing ability of plasma (sposobnost plazme da reducira željezov (III) ion)

GSH-Px – glutation peroksidaza

HPLC – engl. high performance liquid chromatography (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti)

IC<sub>50</sub> – koncentracija antioksidansa koja uzrokuje 50% inhibicije DPPH

MBEK – minimalna koncentracija eradikacije biofilma

MFBF – kolekcija sojeva Zavoda za mikrobiologiju, Fakulteta Farmacije i Biokemije

MIK – minimalna inhibicijska koncentracija

MIK<sub>80</sub> – minimalna inhibicijska koncentracija na 80% testiranih sojeva

NK stanice – eng. natural killer cells (prirodne stanice ubojice)

ORAC – eng. oxygen radical absorbance capacity (kapacitet apsorpcije radikala kisika)

PBS – eng. phosphate-buffered saline (fiziološka otopina puferirana fosfatima)

PEG – polietilenglikolsko otapalo

RA – eng. reverse antibiotic (obrnuti antibiotik)

ROS – slobodni radikali kisika

RPMI – eng. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (medij rasta u staničnoj kulturi)

SD – standardna devijacija

SOD – superoksid dismutaza

SV – srednja vrijednost

TPP - trifenilfosfin

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazin

TTC – eng. triphenyl tetrazolium chloride (trifenil tetrazolijev klorid)

UV-Vis – detektor u ultraljubičastom i vidljivom spektru svjetlosti

XTT – 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-karboksanilid

## **Popis priloga (tablica i slika)**

Tablica 1. Postotak otopljenog propolisa u svakoj otopini

Tablica 2. Vremena zadržavanja (retencije - tR) pojedinih biomarkera propolisa

Tablica 3. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIK80) ekstrakata propolisa

Tablica 4. Minimalne koncentracije eradikacije biofilma (MBEK, %) ekstrakata propolisa

Tablica 5. Srednje vrijednosti (SV) i standardne devijacije (SD) sposobnosti vezanja slobodnih radikala (DPPH) i reduciranja iona željeza, odnosno antioksidacijskog kapaciteta plazme (FRAP) etanolnih ekstrakata propolisa (EEP) i bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP)

Slika 1. Kromatogrami 10 spojeva utvrđenih u etanolnim ekstraktima propolisa (EEP) na HPLC-UV-VISu: a) EEP 1, b) EEP 2, c) EEP 3

Slika 2. Kromatogrami 10 spojeva utvrđenih u bezalkoholnim ekstraktima propolisa (BEP) na HPLC-UV-VISu: a) BEP 1, b) BEP 2, c) BEP 3

Slika 3. Zastupljenost biomarkera u alkoholnim otopinama ekstrakta propolisa (otopine EEP1-3) i u bezalkoholnim otopinama ekstrakta propolisa (otopine BEP1-3)

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	3
2.1. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA.....	3
2.1.1. ZLATNA ERA ANTIBIOTIKA.....	3
2.1.2. POSTANTIBIOTSKA ERA.....	3
2.2. APITERAPIJA.....	4
2.3. PROPOLIS.....	6
2.3.1. OPĆE KARAKTERISTIKE.....	6
2.3.2. STANDARDIZACIJA I KEMIJSKI SASTAV NAJZASTUPLJENIJH TIPOVA PROPOLISA.....	7
2.3.3. ANTIMIKROBNI UČINAK.....	8
2.3.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK.....	9
2.3.5. MARKERI BIOLOŠKE AKTIVNOSTI (BIOMARKERI).....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. IZRADA OTOPINA EKSTRAKTA PROPOLISA.....	14
3.2. ANALIZA BIOMARKERA OTOPINE EKSTRAKTA PROPOLISA.....	14
3.3. ANTIMIKROBNA UČINKOVITOST EKSTRAKATA PROPOLISA.....	15
3.3.1. ODREĐIVANJE MINIMALNIH INHIBICIJSKIH KONCENTACIJA (MIK).....	15
3.3.2. ODREĐIVANJE MINIMALNIH KONCENTRACIJA ERADIKACIJE BIOFILMA (MBEK).....	15
3.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA PROPOLISA.....	16
3.4.1. METODA ODREĐIVANJA SPOSOBNOSTI PLAZME DA REDUCIRA ŽELJEZOV (III) ION.....	16
3.4.2. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI VEZANJA RADIKALA DPPH METODOM.....	16
3.5. STATISTIČKA ANALIZA.....	17
4. REZULTATI.....	18



4.1.	ANALIZA EKSTRAKATA PROPOLISA HPLC-UV-VIS-OM.....	18
4.2.	ANALIZA ANTIMIKROBNOG UČINKA EKSTRAKATA PROPOLISA .....	21
4.3.	ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA PROPOLISA.....	22
5.	RASPRAVA .....	23
6.	ZAKLJUČCI.....	28
7.	POPIS LITERATURE.....	29
8.	SAŽETAK.....	39
9.	SUMMARY .....	40
10.	ŽIVOTOPIS .....	41

## 1. UVOD

Otkrićem prvog antibiotika započeo je novi period u razvoju moderne medicine (PLAYFAIR, 2004.). Mogućnost izoliranja i uzgoja bakterija, koje su prepoznate kao uzročnici bolesti, ali isto tako i proizvodnja bioaktivnih metabolita, ubrzali su razvoj i istraživanje novih antimikrobnih lijekova (MOHR, 2016.). Paralelno s razvojem borbe protiv mikroorganizama, otkriveno je da se vremenom razvija antimikrobna rezistencija. Naime, s razvojem novih generacija lijekova, kojih je do danas otkriveno više od 150, na značajan dio istih razvila se rezistencija (TANWAR i sur., 2014.). Razvoj rezistencije na antibiotike predstavlja ozbiljnu prijetnju javnom zdravstvu. Stoga interes za istraživanjem novih lijekova i mješavina antimikrobnog djelovanja iz izvora prirodnog porijekla je proces koji je svakim danom sve važniji, a kao izvor potencijalnih novih lijekova antimikrobnog djelovanja prednjače biljke (FALZON i BALBANOVA, 2017.) ili tvari životinjskog podrijetla, poput pčelinjih proizvoda.

Terapijska primjena pčelinjih proizvoda naziva se apiterapija (ŞENEL i DEMIR, 2018.). Opisano je šest glavnih pčelinjih proizvoda, različitog kemijskog sastava, a ovisno o istome, i različitim funkcijama unutar pčelinje košnice, ali i različitog učinka povoljnog za zdravlje ljudi i domaćih životinja. Med pčelama predstavlja energetski izvor, matična mliječ služi kao nutritivni izvor matici koji joj osigurava duži životni vijek, a samim time i osiguranje kontinuiteta pčelinje zajednice, dok je pčelinji pelud izvor raznih hranjivih tvari (vitamina, minerala, proteina, šećera) neophodnih za podizanje podmlatka. Kao građevni materijal pčele koriste vosak i propolis, no propolis im zbog svojih antimikrobnih i antioksidativnih svojstava služi i kao antiseptik u košnici (PIETTA i sur., 2002.). Pčele se štite uz pomoć pčelinjeg otrova. Svi se navedeni pčelinji proizvodi koriste u kozmetologiji i u medicini.

Propolis je mješavina tvari smolaste konzistencije, koju pčele tragačice proizvode miješajući smolu s biljnih pupoljaka s pčelinjim voskom, peludom te vlastitom slinom (enzimska komponenta), kako bi dobile smjesu dovoljno kompaktnu za popravljavanje oštećenja košnice (PIETTA i sur., 2002.).

Kemijski sastav propolisa složen je i ovisan o geografskom i biljnom podrijetlu sirovi oblik propolisa sadrži više od 300 različitih kemijskih spojeva (HUANG i sur., 2014.). Zbog složenosti sastava njegova farmaceutska standardizacija predstavlja izazov, pa se predlažu različiti pristupi standardizaciji – od one prema ukupnom sastavu polifenola, do standardizacije prema botaničkom podrijetlu (BANKOVA, 2005a.). Bez obzira na razliku u sastavu, različiti

uzorci propolisa pokazuju slične biološke učinke: antimikrobne, protuupalne, antioksidativne, imunomodulacijske i antitumorske (BANKOVA, 2005b.).

S obzirom na pretpostavku da će koncentracija nekih aktivnih tvari u propolisu (tzv. markera biološke aktivnosti) korelirati s biološkim učincima, cilj ovog istraživanja bio je usporediti koncentracije deset takvih tvari u različitim tekućim ekstraktima propolisa, alkoholnim i bezalkoholnim, s antimikrobnim i antioksidativnim učinkom.

## **2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA**

#### **2.1.1. ZLATNA ERA ANTIBIOTIKA**

Otkriće prvog antibiotika penicilina je označilo početak ere antibiotika. Alexander Fleming je 1928. godine opazio sposobnost inhibicije bakterijskog rasta, od strane kontaminanta plijesni *Penicillium notatum* (AMINOV, 2010.). Flemingovo opažanje poslužilo je kao temelj budućih istraživanja novih antimikrobnih lijekova, kao i samog penicilina 1940-ih godina, kojima je dokazan potencijal penicilina odnosno sposobnost kočenja bakterijskih infekcija (LIGON, 2004.). Široka primjena novootkrivenog antibiotika pdovela je do pojave rezistentnih sojeva, koja je potaknula razvoj polusintetskih antibiotika, odnosno druge generacije penicilina. Uzak spektar aktivnosti i potreba za snažnijim djelovanjem protiv gram negativnih bakterija bila je poticaj za proširenje spektra djelovanja antibiotika druge te kasnijih generacija. 1960-ih godina uvedena je treća generacija penicilina proširenijeg spektra aktivnosti, aminopenicilini, koji su u odnosu na prethodne bili učinkovitiji protiv gram negativnih bakterija poput *Escherichiae coli*, *Salmonellae spp.*, zahvaljujući boljoj otpornosti na penicilinazu. Zadnja generacija penicilina, poput karboksipenicilina proširila je već široki spektar djelovanja protiv gram negativnih bakterija i pokazala snažnu aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginose* (PRESTON i DRUSANO, 2016.). Prvi cefalosporin izoliran je iz plijesni *Cephalosporium acremonium* 1945. godine (BO, 2000.). Nekoliko novih generacija antibiotika razvijeno je putem različitih kemijskih modifikacija izoliranih prirodnih spojeva, proširujući spektar aktivnosti.

#### **2.1.2. POSTANTIBIOTSKA ERA**

Nedugo nakon otkrića prvog antibiotika, Fleming je već ranih 1940-ih godina predvidio početak ere zloupotrebe samih lijekova, odnosno njihovog prekomjernog i ponekad nepotrebnog korištenja (BARTLETT i sur., 2013.). Prva pojava rezistencije na antibiotike zabilježena je vrlo brzo nakon otkrića prvog antibiotika. Porodica bakterija s visokom stopom rezistencije na aminopenicilin jesu *Enterobacteriaceae*, posebice sojevi vrste *E. coli* (PATERSON, 2006.), čija je sposobnost inaktivacije penicilina penicilinazom dokumentirana već 1940. godine. Približno dvije trećine invadirajućih sojeva imenovane bakterije, u vremenskom periodu između 1950. i 2001. postale su ampicilin rezistentne (BOUZA i

CERCENADO, 2002.), dok je stopa aminopenicilin rezistentnih sojeva i dalje u porastu. Slijedeći u nizu bakterija koji su se uspješno odupirali antibioticima postala su i četiri soja *S.s aureusa* često pronađena u hospitaliziranih pacijenata. Omjer infekcija uzrokovan navedenom bakterijom porasao je u kratkom vremenu i rezultirao razvojem rezistencije (LOWY, 2003.). Iako je meticilin privremeno zaustavio brzo širenje rezistencije, je izazvao rezistenciju u gotovo 29 % sojeva *S. aureusa*, uzročnika bolničkih infekcija (ZAFFIRI i sur., 2013.). Jednaki, rastući trend pojave rezistentnih bakterija uslijedio je veoma brzo nakon otkrića svake iduće generacije antibiotika. Jasno je da je prekomjerna i često neracionalna primjena antibiotika povezana s razvojem rezistencije na iste. Prekomjerna primjena antibiotika standardna je pojava u stočarstvu, posebno u zemljama u kojima se antibiotici još uvijek koriste i kao promotori rasta i time doprinose razvoju rezistencije. Uz ljude koji se rezistentim sojevima inficiraju putem kontaminiranih namirnica, ugrožen je i okoliš koji se kontaminira ekskretima tretiranih životinja (WRIGHT, 2010.). Ovakva javnozdravstvena prijetnja zahtjeva razrađene metode objedinjenog praćenja primjene antibiotika, kao i osjetljivosti bakterijskih sojeva na antibiotike (TURNIDGE, 2014.). Rezistencija na antibiotike je problem globalnih razmjera, koji obuhvaća ne samo medicinsku i znanstvenu zajednicu, već i društvo u cjelini.

## 2.2. APITERAPIJA

Medonosna pčela (lat. *Apis mellifera*) pripada koljenu člankonožaca (lat. *Arthropoda*), razredu insekata (lat. *Insecta*), redu opnokrilaca (lat. *Hymenoptera*), porodici *Apidae* i rodu *Apis*. Riječ je o izrazito društvenim insektima, čija je najpoznatija karakteristika skladištenje meda i ostalih tvari koje su potencijalno ljekovite za ljude, ali i za domaće životinje. Trenutno su poznate dvije domestificirane vrste pčela, prva je vrsta *A. mellifera* podrijetlom iz Europe, Azije i Afrike, a unesena je i u Ameriku. Podvrsta imenovane vrste pčele *A. mellifera Caucasica* najmarljivija je od svih do sada opisanih podvrsta. Vrste *A. cerana* i *A. florea* rasprostranjene su u južnoj i jugoistočnoj Aziji, te ih ne karakterizira sakupljanje proizvoda. Uzimajući u obzir važnost otkrića novih lijekova iz prirodnih izvora, ovaj je rad usmjeren na istraživanje učinkovitosti pčelinjih proizvoda, posebice propolisa, odnosno njegovih tekućih ekstrakata.

Narodna medicina je, osim prirodno dostupnih terapeutika na biljnoj bazi, koristila i one životinjskog podrijetla, poput pčelinjih proizvoda, a korištenje istih opisano je u brojnim pisanim povijesnim zapisima. Razvoj i opseg širenja pčelarstva u posljednjih deset godina se povećao zbog sve većeg podizanja svijesti o sve bržem nestanku ove životinjske vrste kako u

znanstvenim, tako i u laičkim krugovima. Apiterapija predstavlja granu narodne medicine, čije se umijeće temelji na primjeni pčelinjih proizvoda u očuvanju zdravlja ljudi, ali i životinja (FRATELLONE i sur., 2016.). Glavni pčelinji proizvod je med, a proizvode ga pčele tragačice koje sakupljaju cvjetni nektar te ga kontinuirano probavljaju i regurgitiraju, i pohranjuju u stanicama saća. Zajedničkim djelovanjem kiselog želučanog pH i probavnih enzima invertaze, diastaze i amilaze stvara se zasićena vodena otopina sastavljena od 80 % šećera, uglavnom fruktoze i glukoze. Ostali pčelinji proizvodi predstavljaju mješavinu žljezdanog sekreta pčela i različitih biljnih materijala, kao samostalni proizvodi ili pomiješani međusobno, a riječ je o matičnoj mliječi, pčelinjem vosku, propolisu, pčelinjem peludu i pčelinjem otrovu. Matična mliječ je bijelo-žućkasta, želatinozna i kisela mješavina sekreta hipofarinksa i mandibularnih žlijezda slinovnica pčela, a sadrži oko 67 % vode, zatim šećere, proteine i aminokiseline, masti te enzime, vitamine, minerale i fenolne kiseline, sa značajnom varijabilnošću između različitih biljnih izvora (MELLIU i CHINO, 2005.). Pčelinji pelud pčele tragačice nožicama unose u košnicu nakon oprašivanja biljaka, te ga pohranjuju u stanice saća, gdje se isti miješa sa sekretima žlijezda slinovnica te fermentacijom postaje takozvani pčelinji kruh ili perga i predstavlja glavnu energetska zalihu za cjelokupnu koloniju pčela (ALMEIDA-MURADIAN i sur., 2005.). Pčele radilice izlučuju pčelinji vosak pomoću voštanih žlijezda smještenih na četiri posljednja trbušna kolutića. Pčelinji vosak u najvećoj količini proizvodi se u fazi rasta pčelinje kolonije u kasno proljeće, a služi za izgradnju saća. Pčelinji otrov ili apitoksin je sekret otrovne žlijezde, dijela žučnog sustava pčele, a isti pčela ubrizgava ubodom žalcem u potencijalnog neprijatelja u svrhu vlastite ili zaštite kompletne pčelinje zajednice. Riječ je o gustoj bezbojnoj tekućini specifičnog mirisa, većinski građenog od vode, oko 80 %, dok ostatak čini suha tvar, peptidi, melitinin i apamin, enzimi poput fosfolipaze A2 i aktivni bioamini poput histamina i kateholamina (LEE i BAE, 2016.). Glavna barijera u primjeni pčelinjih proizvoda u modernoj apiterapiji zapravo jesu mnogobrojne varijacije u sastavu proizvoda koje su vrsno specifične (DENISOW i DENISOW-PIETRZYK, 2016.). Stoga opisane sastavne varijacije različito pridonose svojstvima i biološkoj aktivnosti pčelinjih proizvoda, a samim time i biološkim učincima. Sekundarna, ali svakako ne manje bitna barijera je i manji broj dostupnih podataka o farmakokinetici, ali i toksokinetici navedenih proizvoda. S obzirom na navedeno, značajno je za spomenuti, da su pčelinji proizvodi otvorili golemi novi prostor za provođenje brojnih istraživanja njihove učinkovitosti.

## 2.3. PROPOLIS

### 2.3.1. OPĆE KARAKTERISTIKE

Prema određenim izvorima naziv „propolis“ potječe iz starogrčkog jezika, a isti tvore dvije riječi „pro“ = prije ili ispred te „polis“ = grad (BOGDANOV, 2015.), no postoji i mogućnost da naziv dolazi od latinske riječi „propoliso“ odnosno zamazivati ili zaglađivati. Oba izvora opisa nastanka naziva ove smolaste i aromatske tvari, vrlo dobro opisuju funkciju iste unutar pčelinje košnice. Prvo značenje „ispred grada“ izvrsno pristaje zaštitničkoj ulozi, koju propolis provodi u odnosu na cijelu pčelinju koloniju, a ta je da štiti ulaz pčelinje košnice od različitih uljeza, ali i unutar pčelinje košnice gdje ga pčele koriste za zamatanje trupla štetnika, čime se prevenira nastanak i širenje infekcije i održava antiseptični okoliš. Drugo značenje „zamazivati“ tj. „zaglađivati“ vrlo dobro odgovara već opisanoj ljepljivoj konzistenciji propolisa, a s obzirom na istu, pčele ga koriste u svrhu zaglađivanja unutarnjih zidova košnice, odnosno ispunjavanja nastalih oštećenja na vanjskoj površini košnice (TLAK GAJGER i sur., 2017.).

Unutar pčelinje košnice, svega nekoliko pčela tragačica, ne starijih od 15 dana, specijalizirano je za prikupljanje propolisa, ljepljive prirodne tvari, nalik na smolasti materijal, a istu sakupljaju s pupova različitih biljaka. Tako sakupljen, propolis se finalno oblikuje miješanjem s ostalim pčelinjim proizvodima, poput pčelinjeg voska i peluda, ali i sekretom submandibularnih žlijezda slinovnica, odnosno pčelinjim enzimima iz sline (SFORCIN, 2016.). Pčele u umjerenom klimatskom pojasu sakupljaju propolis krajem ljeta i početkom jeseni, kada se pripremaju na zimovanje. U jednom letu, od paše do košnice, jedna pčela tragačica prikupi otprilike 10 mg propolisa. Pretpostavljajući da prosječna pčelinja kolonija godišnje prikupi oko 100 g propolisa, smatra se da pčele tragačice u tu svrhu obave 100000 letova.

Na području Južne Amerike, u tropskom klimatskom pojasu, propolis prikupljaju tropske pčele s nerazvijenim žalcem (lat. *Meliponinae*), a pripadaju vrsti *Melipona anthidioides*. Neke od njih propolis, osim s pčelinjim voskom, miješaju i s tlom te tvore takozvani geopropolis, dok druge propolis miješaju s cerumenom, tvari analognoj pčelinjem vosku kod medonosnih pčela, te ga koriste kao adheziv pri gradnji gnijezda.

### 2.3.2. STANDARDIZACIJA I KEMIJSKI SASTAV NAJZASTUPLJENIJH TIPOVA PROPOLISA

Kemijski sastav propolisa kao bioaktivne tvari nije stalan, već je promjenjiv, s obzirom da pčele izabiru botaničke predstavnike različitih ekosustava kao izvore za stvaranje propolisa. Varijabilan kemijski sastav propolisa ovisi o geografskoj lokaciji mjesta sakupljanja biljaka, o pripadajućem klimatskom pojasu iste te o cvjetnom sastavu već navedene geografske lokacije. U vezi s već opisanim, dakako da je poznat velik broj različitih tipova propolisa tipičnih za pojedina područja. 1970. godine znanstvenik Popravko podrijetlom iz Rusije prvi je koji je analizom flavonoida propolisa i usporedbom istih s eksudatima pupoljaka topole (lat. *Populus*) i breze (lat. *Betula*) predstavio kemijske dokaze o botaničkom podrijetlu propolisa (BOGDANOV i BANKOVA, 2017.). Uslijedile su mnoge publikacije, te je u današnje vrijeme općeprihvaćeno, ali i kemijski dokazano, da su pupoljci topole i njihovi hibridi, glavni izvor pčelinjeg ljepila u umjerenom klimatskom pojasu (POPOVA i sur., 2005.). Na području Europe, osim najzastupljenijeg europskog *poplar* tipa propolisa, prošireni su još i mediteranski tip propolisa s Malte, čiji je glavni izvor čempres (lat. *Cupressus*) (POPOVA i sur., 2012.) i ruski tip, u čijem se sastavu osim najzastupljenijih biljnih eksudata topole, pojavljuju i eksudati breze (lat. *Betula verrucosa*, *Betula pubescens*, *Betula litwinowii*) i jasike (lat. *Populus tremula*) (ISIDOROV i sur., 2014.). Uz europski *poplar* tip, drugi najzastupljeniji tip propolisa svakako je tropski brazilski zeleni tip ili *baccharis* tip, čiji je glavni izvor lišće biljke *Baccharis dracunculifoliae* (TAZAWA i sur., 1998.). Na području Brazila, osim zelenog tipa, rasprostranjen je i takozvani crveni tip propolisa, a isti pčele prikupljaju s pupoljaka palisandrovine (lat. *Dalbergia*), te ga karakterizira prisutnost izoflavonoida (DAUGSCH i sur., 2008.). Do sada je identificirano više od 300 kemijskih spojeva koji tvore propolis, a povezani su s njegovom bioaktivnošću i potencijalnom terapijskom upotrebom (BANKOVA i sur., 2014.). Spojevi polifenolične frakcije, posebice flavonoidi, aromatične kiseline, esteri fenolične kiseline i triterpeni najčešće određuju bioaktivnost propolisa. Balzam europskog tipa propolisa potječe od sakupljenih smolastih tvari biljnog podrijetla, dok ostatak tvore tvari dodane od pčela, pčelinji vosak (20-35 %), minerali (2,1 %) i karbohidrati. Sveukupni sadržaj brazilskog tipa propolisa, sličan je onom europskog tipa, te u osnovi većinski dio sastava čine biljne sastavnice, dok manji dio sastava oblikuju pčelinji vosak (15-25 %) i pelud (5 %). Ipak kemijski sastav navedena dva tipa propolisa u potpunosti se razlikuje. Dominantni aktivni kemijski spojevi europskog tipa propolisa jesu fenoli (40-70 %) poput fenolne kiseline i njezinih estera, te flavonoida, dok se u sastavu brazilskog tipa propolisa većinski pojavljuju derivati p-kumarinske kiseline i cimetine kiseline (45-70 %) (BANKOVA i sur., 2014.). Flavonoidi se



razlikuju od onih detektiranih u europskom tipu propolisa. Zahtjevi za standardizacijom prirodnih proizvoda, među kojima i propolisa, sve češći su zahvaljujući znanstveno dokazanim doprinosima zdravlju ljudi i životinja (BANSKOTA i sur., 2001.). Uzimajući u obzir visok broj bioaktivnih kemijskih spojeva u propolisu, standardizacija propolisa predstavlja svojevrsni izazov. Spoznaje o botaničkom podrijetlu propolisa korisne su jer služe kao osnova za kemijsku standardizaciju propolisa, te su uvelike olakšale već opisani komplicirani proces (BANKOVA, 2005.). Navedene spoznaje bitne su i za same pčelare, koji su tako sigurni, da područje koje čini opseg letenja uzgajanih kolonija pčela obiluje njima potrebnim biljkama. U suprotnom, kada nisu u mogućnosti prikupljanja propolisa, pčele prikupljaju njegove supstituente, poput boja i mineralnih ulja, koji mogu ozbiljno ugroziti učinkovitost korištenja pčelinjih proizvoda u farmaceutskoj industriji.

### 2.3.3. ANTIMIKROBNI UČINAK

Zbog vrlo složenog kemijskog sastava, propolis ima širok spektar bioloških aktivnosti, koje uvjetuju njegov ljekoviti potencijal, što ga čini predmetom istraživanja širom svijeta. Propolis se vrlo često koristi u svrhu ublažavanja simptoma infekcija respiratornog sustava, gdje ostvaruje antimikrobni, antiseptični i protuupalni učinak. Mnogi korisni učinci propolisa ovise o njegovu antimikrobnom učinku (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). Unatoč velikim razlikama u kemijskom sastavu tipova propolisa, svaki tip posjeduje antimikrobni učinak, pa su tako potvrđeni antibakterijski, fungicidni, antivirusni, pa čak i antiparazitski učinci (KUJUMGIEV i sur., 1999.). Smatra se da je taj učinak rezultat zajedničkog, a ne pojedinačnog djelovanja aktivnih tvari propolisa (KUJUMGIEV i sur., 1999.). Svi poznati tipovi propolisa, usprkos različitom kemijskom sastavu, imaju dobru antibakterijsku aktivnost (BANKOVA, 2005.), koja je vrlo slična uspoređujući europski tip propolisa s ostalim najraširenijim tipovima. Nositelji antibakterijskog učinka u sastavu europskog topola tipa propolisa jesu različiti flavonoidi, fenolne kiseline i njezini esteri (FAROOQUI i FAROOQUI, 2010.), dok istu funkciju u sastavu brazilskog zelenog tipa propolisa obavljaju p-kumarinska kiselina i diterpeni (BANKOVA, 2005.). Uspoređujući podvrste medonosne pčele, koje sakupljaju europski tip propolisa, najjači antibakterijski učinak pokazao je onaj tip propolisa, sakupljen od strane *A. mellifera caucasica* (SILICI i KUTLUCA, 2005.). Propolis pokazuje jaču aktivnost protiv gram pozitivnih bakterija, iako inhibira i rast brojnih gram negativnih bakterija. Neke od gram pozitivnih bakterija protiv kojih propolis djeluje jesu *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*,

*Mycobacterium spp.*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, dok u gram negativne bakterije protiv kojih propolis pokazuje aktivnost ubrajamo *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (VICTORINO i sur., 2007.) te različite sojeve salmonela. Na navedene bakterije propolis djeluje baktericidno, odnosno usmrćuje ih inhibirajući njihovu pokretljivost (PEPELJNIAK i KOSALEC, 2004.). Flavonoidi iz propolisa povećavaju propusnost unutarnje mitohondrijske membrane i gubitak membranskog potencijala, čime je pokretačka sila protona preko membrane, kao i protok elektrona poremećen. Bakterije na taj način gube sposobnost sinteze ATP-a i pokretljivosti, postaju manje virulentne, te naposljetku umiru (XIAO i sur., 2014). Uz to, propolis zajedno s antibioticima prilikom inhibiranja rasta i razmnožavanja bakterija djeluje sinergistički (ONLEN i sur., 2007.). Fungicidna aktivnost propolisa je dokazana na više od 40 sojeva gljivica *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* i *Trichosporon spp* (KOC i sur., 2011.). Pinocembrin, galangin, benzoična i salicilna kiselina zaslužne su za opisanu aktivnost europskog topola tipa propolisa, dok su mono - i seskviterpeni i artipelin C zaslužni za istu aktivnost brazilskog zelenog tipa propolisa. Propolis pokazuje fungicidnu aktivnost i protiv gljivica *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma encapsulatum*, *Microsporum canis* i *Trichophyton mentagrophytes* te *Trichophyton rubrum*.

#### **2.3.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK**

Reaktivne kisikove vrste (RKV) se u niskim koncentracijama stvaraju kao nusproizvodi u fiziološkim procesima, poput stanične diferencijacije ili apoptoze. Kada se njihova produkcija poveća, te organizam nije u stanju neutralizirati ih i dovesti se u stanje homeostaze dolazi do razvoja oksidacijskog stresa, stanje neravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih molekula, u korist prooksidativnih, i posljedičnog oštećenja tkiva (SIES i JONES, 2007.), a na molekularnoj razini dolazi do modificiranja proteina i oštećenja DNK. Smatra se da je oksidacijski stres jedan od pogodnih čimbenika za razvoj kroničnih i degenerativnih bolesti, poput karcinoma, autoimunih bolesti, katarakte, reumatoidnog artritisa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Antioksidansi su molekule koje su u mogućnosti spriječiti ili usporiti oksidaciju drugih molekula, ukloniti RKV i onemogućiti stvaranje oksidacijskog stresa. Endogeni antioksidansi podijeljeni su u dvije glavne skupine. Enzimi s antioksidativnom sposobnošću jesu superoksid dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GSH-Px), katalaza (CAT) i paraoksonaza te predstavljaju glavnu razinu zaštite od oksidacijskog stresa.

Antioksidansi jesu i brojne neenzimske molekule poput vitamina C i E,  $\beta$ -karotena, albumina i transferina.

U usporedbi s ostalim pčelinjim proizvodima, poput pčelinjeg peluda i matične mliječi, ekstrakti propolisa pokazuju najvišu antioksidativnu aktivnost (NAKAJIMA i sur., 2009.). Iako zastupljenost fenola u kemijskom sastavu propolisa varira ovisno o biljnom podrijetlu i geografskoj lokaciji, sposobnost antioksidativne aktivnosti mnogih tipova propolisa je dokumentirana, kao i korelacija navedene aktivnosti s ukupnom koncentracijom polifenola (KUMAZAWA i sur., 2004.). Usporedbom antioksidativnog učinka dva najzastupljenija tipa propolisa, zaključeno je da europski topola tip propolisa u odnosu na brazilski zeleni tip pokazuje višu aktivnost zahvaljujući relativno većem ukupnom sadržaju polifenola (KOSALEC i sur., 2007.). Antioksidativna aktivnost razlikuje se ovisno o tipu polifenola. Tipičan spoj koji zajedno s ostalima oblikuje kemijski sastav europskog topola tipa propolisa je i CAPE, a za isti se smatra da je najjači antioksidans propolisa. Antioksidativni učinak različitih tvari mijeri se u različitim jedinicama. Već spomenuti učinak propolisa mijeri se takozvanim ORAC indeksom, a isti pokazuje sposobnost apsorbancije slobodnih kisikovih radikala. Sirovi smolasti oblik propolisa u odnosu na tekuće ekstrakte propolisa, ekstrahirane u 50:50 vodenoj otopini vode i acetona, postigao je najveći rezultat, 9674 ORAC jedinica (HUDNALL, 2007.). Antioksidativni učinak propolisa očituje se u moduliranju antioksidativnih enzima i snižavanju lipidne peroksidacije u jetrima, plućima i mozgu. Jačina učinka naravno ovisi o dozi apliciranog propolisa te o tkivu koje je zahvaćeno početnim stadijem oksidacijskog stresa. Organ koji je najosjetljiviji na oksidacijski stres jesu pluća, u kojima se vrlo brzo razvije stanje hiperoksije. Propolis moduliranjem, odnosno povećanjem aktivnosti enzima katalaze štiti pluća od prezasićenosti kisikom, koja nisu u mogućnosti samostalno potaknuti povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, a pogotovo u stanjima prolongirane izloženosti visokim koncentracijama kisika (SOBOČANEC i sur., 2006.).

### 2.3.5. MARKERI BIOLOŠKE AKTIVNOSTI (BIOMARKERI)

Propolis je moguće standardizirati i bioprofiliranjem, odnosno određivanjem biomarkera u ekstraktima propolisa (SHAWKY i IBRAHIM, 2018.). Prema Nacionalnoj radnoj skupini za definiranje biomarkera, biomarker je karakteristika koja se objektivno mjeri i procjenjuje kao indikator normalnih bioloških ili patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapijsku intervenciju.

Flavonoidi pripadaju skupini prirodnih polifenola koji se nalaze u gotovo svim biljnim tkivima. Biljkama pružaju zaštitu od štetnog UV zračenja, različitih patogena i biljojeda te vizualno privlače oprašivače (HARBORNE i WILLIAMS, 2000.). Skupini flavonoida pripadaju flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, izoflavonoidi i antocijanidini (KABERA i sur., 2014.).

Apigenin jedan je od najčešćih biljnih flavonoida i pripada podrazredu flavona (BHAGWAT i sur., 2011.). Apigenin pokazuje dobar antimikrobni učinak. Na životinjskom modelu sa izazvanom *S. aureus* upalom pluća, apigenin nije u potpunosti inhibirao rast bakterije, no zaslužan je za smanjenu sintezu bakterijskog toksina,  $\alpha$ -hemolizina (DONG i sur., 2013.). Apigenin pokazuje i RA (eng. reverse antibiotics) učinak protiv kinolon-rezistentnog *S. aureusa* (MORIMOTO i sur., 2015.). Kombiniranom primjenom ceftazidima i apigenina, smanjena je ceftazidim-rezistencija kod *Enterobacter cloacae*. Navedeno je rezultat inhibicije sinteze peptidoglikana, enzima  $\beta$ -laktamaze i povećane permeabilnosti vanjske i citoplazmatske membrane (EUMKEB i CHUKRATHOK, 2013.).

Krizin je prirodni flavonoid i pripada podrazredu flavona. Bakterije poput *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* pokazuju osjetljivost na krizin (ADAMCZAK i sur., 2020.). Krizin prodire kroz bakterijsku membranu i destabilizira ju, što rezultira koagulacijom i istjecanjem staničnog materijala te završno baktericidnim učinkom (CUSHNIE i LAMB, 2011.). Pokazuje zaštitni učinak u brojnim tkivima, uključujući mozak, srce, jetra, bubrege i pluća prilikom toksičnog učinka određenih tvari (NABAVI i sur., 2015.). Djeluje kao antioksidans prilikom hepatotoksičnog učinka kemoterapeutika metotreksata. Poboljšava histopatološke promjene i apoptozu hepatocita tako što smanjuje sintezu alanin transaminaze i laktat dehidrogenaze te povisuje sintezu superoksid dismutaze i katalaze (ALI i sur., 2014.).

Galangin je biljni flavonoid, pripada podrazredu flavonola i zaslužan je za iskazivanje antimikrobnog učinka propolisa (HEGAZI i sur., 2000.). Djeluje baktericidno protiv *S. aureus*, *Enterococcus spp.* i sojeva *P. aeruginosa* (PEPELJNJAK i KOSALEC, 2004.), inhibirajući sintezu nukleinske kiseline i funkciju citoplazmatske membrane. Galangin uzrokuje povećanu

osjetljivost kod kinolon rezistentnih sojeva *S.aureus* s mutiranom gyrB podjedinicom DNK giraze, inhibirajući navedeni enzim (CUSHNIE i LAMB, 2005.). Inkubacija u mediju sa 50 µg/mL galangina izazvala je smanjenje CFU jedinica *S. aureusa* i do 60 puta, narušen integritet citoplazmatske membrane i propuštanje i do 20% više kalija (CUSHNIE i LAMB, 2005.).

Kempferol je prirodni flavonoid i pripada podrazredu flavonola, te se nalazi u mnogim jestivim biljkama (RICE-EVANS, 2001.). Pokazuje mnogobrojne biološke učinke na ljudske i životinjske stanice, poput antioksidativnog (KAMPKÖTTER i sur., 2007.), protuupalnog, antitumorskog i antimikrobnog učinka (TATSIMO i sur., 2012.). Antioksidativni učinak temelji se na sposobnosti kempferola da u niskoj zastupljenosti ukloni visoke koncentracije superoksidnog aniona, inače potrebnog za proizvodnju i kisikovih i dušičnih spojeva uključenih u oksidacijski stres (SZEWCZYK i sur., 2014.). WEIWEI i sur. (2018.) tvrde da je ukupan antioksidativni učinak kempferola približno dva puta jači u odnosu na ostale prirodne antioksidanse. Navedeni autori uočili su pozitivan učinak kempferola na ljudske epitelne stanice pigmenta retine, koje je zaštitio od oksidativnih oštećenja i apoptoze izazvanih vodikovim peroksidom, putem snižene ekspresije Bax i kaspaze-3 proapoptotičkih proteina te povišene ekspresije Bcl-2 antiapoptotičkih proteina.

Pinocembrin je flavanon koji tvori 606-701 mg/g balzama propolisa, ako se isti ekstrahira 70%-tnim etanolom (ESCRICHE i JUAN-BORRAS, 2018.). Iako ne inhibira rast *S.aureusa*, pinocembrin smanjuje transkripciju *Hla* gena koji kodira tvorbu  $\alpha$ -hemolizina (SOROMOU i sur., 2013.). Pruža snažan antioksidativni učinak prilikom razvoja cerebralne ishemije i brojnih neurodegenerativnih bolesti. Smanjuje proizvodnju ROS-a, dušikovog oksida, neuronske NO sintaze te tako postiže neurozaštitu (YING i sur., 2011.).

Trans-cimetna kiselina pripada fenolnim kiselinama te se nalazi u gotovo svim biljnim tkivima, posebice u staničnoj stijenci biljnih stanica i reproduktivnim organima biljaka (KROON i WILLIAMSON, 1999.). Pokazuje dobar antimikrobni učinak protiv *M. tuberculosis* i njezinih brojnih višestruko rezistentnih izolata (RASTOGI i sur., 1998.). Djeluje sinergistički s amikacinom, ofloksacinom i klofazimom, lijekovima protiv uzročnika tuberkuloze. Iako trans-cimetna kiselina pokazuje dobar antimikrobni učinak, drugi, cis izomer cimetne kiseline približno je 120 puta učinkovitiji protiv *M. tuberculosis* (CHEN i sur., 2011.).

Trans-ferulinska kiselina pripada skupini fenolnih kiselina te predstavlja najčešći derivat cimetne kiseline (BEZERRA i sur., 2017.). Najvažniji učinak ovog biomarkera je

antioksidativni učinak. Trans-ferulinska kiselina djeluje kao antioksidans mehanizmom hvatanja ROS-a i slobodnih dušikovih radikala, doniranjem vodikovih atoma hidroksilnim i peroksidnim radikalima, zbog čega nastaju stabilni fenoksidni radikali čime se prekida lančana reakcija slobodnog radikala (ZDUNSKA i sur., 2018.). Također kelatno veže ione prijelaznih metala, poput  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Cu}^{2+}$ , čime je spriječeno stvaranje visokoreaktivnih hidroksilnih radikala, koji dovode do peroksidacije stanične membrane (KIEWLICZ i sur., 2015.).

P-kumarinska kiselina je derivat cimetine kiseline i pripada skupini fenolnih kiselina (DAI i MUMPER, 2010.). Pokazuje antimikrobni učinak prekidanjem bakterijske membrane, vezanjem bakterijske DNK te završno apoptozom (LOU i sur., 2012.). Trodnevna odnosno peterodnevna inkubacija stanica uropatogene *E. coli* p-kumarinskom kiselinom spriječava formiranje biofilma i smanjuje broj stanica bakterije (KOT i sur., 2015.). P-kumarinska kiselina kao antioksidans umanjuje oksidacijski stres izazvan mutiranjem superoksid dismutazom1 tako što aktivira autofagiju (UEDA i sur., 2019.).

Kavena kiselina je karakteristična za propolis. Snizuje ekspresiju TLR-2, dok povisuje TLR-4 ekspresiju u ljudskim monocitima. Funkcija toll-like receptora (TLR), transmembranskih proteina, je prepoznavanje PAMPS-a, odnosno različitih očuvanih molekularnih uzoraka povezanih s patogenima, tako TLR-2 prepoznaje komponente iz gram-pozitivnih bakterija i zimozana, dok TLR-4 prepoznaje lipopolisaharid gram-negativnih bakterija (KAWAI i AKIRA, 2009.). Pri koncentraciji od 50 i 100  $\mu\text{g/ml}$  kavena kiselina snizuje ekspresiju TLR-2, dok je ekspresija TLR-4 u ljudskim monocitima povišena pri koncentraciji kavene kiseline od 5  $\mu\text{g/ml}$ , a inhibicijski učinak opažen je korištenjem 100  $\mu\text{g/ml}$  kavene kiseline. Njezine visoke koncentracije inhibirale su aktivnost  $\text{TNF-}\alpha$  i IL-10, a inducirale veću fungicidnu aktivnost ljudskih monocita protiv *C. albicans* (CONTI i sur., 2013.).

Fenetil ester kavene kiseline (CAPE) je aktivna komponenta ekstrakata propolisa i pokazuje antibakterijski (POPOVA i sur., 2005.), protuupalni i antioksidativni učinak (RUSSO i sur., 2002.). Na životinjskom modelu sa izazvanom opstrukcijom crijeva i posljedičnim peritonitisom, intraperitonealna aplikacija CAPE-a (10  $\mu\text{mol/kg day}$ ) smanjila je razinu proupalnih citokina u serumu i bakterijsku translokaciju (FIRATI i sur., 2015.). Navedeni autori tvrde da je CAPE zaslužan i za slabije histopatološke znakove, slabije upaljenu i edematoznu crijevnu sluznicu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. IZRADA OTOPINA EKSTRAKTA PROPOLISA

Propolis je usitnjen standardnom metodom, maceracijom pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h ekstrahiran, nakon čega je neotopljeni ostatak odvojen filtracijom, a bistri filtrat korišten kao modelni tekući ekstrakt propolisa za daljnje ispitivanje. Postotak otopljenog propolisa prikazan je u tablici 1. za svaku otopinu. Izrađene su 3 otopine u etanolu, te 3 u bezalkolnom polietilenglikolskom (PEG) otapalu, bez ili sa dodatkom emulgatora, ovisno o udjelu otopljene sirovine koji se želio postići. Metoda izrade otopina i njihov sastav zaštićeni su patentom br. WO/2020/169425.

Tablica 1. Postotak otopljenog propolisa u svakoj otopini

Otopina br.	Postotak propolisa (%)
Etanol (96%)	
EEP 1 (7)	25,2
EEP 2 (8)	26,9
EEP 3 (17)	30,2
Bezalkolno otapalo (PEG)	
BEP 1 (14)	21,5
BEP 2 (9)	19,8
BEP 3 (16)	21,4

#### 3.2. ANALIZA BIOMARKERA OTOPINE EKSTRAKTA PROPOLISA

Analiza sastava otopina ekstrakta propolisa provela se na Zavodu za prehranu i dijetetiku domaćih životinja Veterinarskog fakulteta metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Vis detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan) kako bi se ustanovila zastupljenost polifenola i ostalih biomarkera u otopini (PELLATI i sur., 2013.). Korištena je kolona Ascentis Express C18 (Supelco, SAD), dimenzija 150 x 3 mm i čestica punjenja promjera 2.7 µm. Mobilna faza se sastojala od 0.1 % mravlje kiseline i metanola, a udio metanola se je mijenjao sa gradijentom; 0-3 min do 20 %, 3-10 min do 30 %, 10-40 min od 30 do 40 %, 40-50 min od 40 do 60 %, 50-60 min od 60 do 80 %, 60-65 min od 80 do 50 %, 100 min do 30 %, 105 min do 20 %. Protok mobilne faze bio je 0.25 ml/min. Temperatura kolone bila je 30°C, a volumen injekcije 10 µl. Detekcija se odvijala na valnoj duljini od 370 nm, a integracija na 290 nm. U takvim uvjetima tlak je bio 210-290 bara.

### **3.3. ANTIMIKROBNA UČINKOVITOST EKSTRAKATA PROPOLISA**

Antimikrobna učinkovitost ekstrakata propolisa mjerila se na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, te su sedredile minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) i minimalne koncentracije eradikacije biofilma (MBEK).

#### **3.3.1. ODREĐIVANJE MINIMALNIH INHIBICIJSKIH KONCENTACIJA (MIK)**

Antimikrobna učinkovitost testirala se na sojevima *S. aureus* (ATCC 29293), *E. coli* (10536), *P. aeruginosa* (27853), MRSA i MSSA (MFBF kolekcija), *E. faecalis* (ATCC 9212 i VRE MFBF kolekcija), *E. coli* (ATCC 10536), *A. baumannii* (ATCC 43498), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) i *C. albicans* (ATCC 90028). Rađen je serijski mikrodilucijski postupak kako bi se odredile minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) ekstrakata. Suspenzije stanica su se pripremale iz matičnih kultura u PBS-u (pH 7.4), te su se uz korištenje nefelometra (BioSan, Njemačka) podesile na 0.5 MacFarlandovih jedinica (ATB 1550, BioMérieux, Francuska). Testiranje se provelo u serijskim razrjeđenjima na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica u rasponu od 100 do 0.7125 µg/ml (otopljenog u Muller Hinton bujonu) tako da se u svaku jažicu dodalo 100 µL otopine ekstrakta propolisa. Nakon inokulacije bakterijske kulture podešene na 10<sup>7</sup> CFU/ml pločice su se inkubirale 24 sata na 37°C. MIK je određen dodavanjem 0.5 mg/mL TTC (redoks indikator) te je nakon inkubacije u trajanju 4 sata pri 30°C spektrofotometrom očitana apsorbancija pri valnoj duljini 490 nm. Vrijednost MIK-a je određena kao koncentracija ekstrakta propolisa pri kojoj dolazi do redukcije broja bakterija za 80 % (MIK<sub>80</sub>).

Za gljivične vrste je MIK određen u RPMI mediju s dodanom glukozom, po istoj shemi kao za bakterije. Nakon inkubacije (48 h, 37°C, aerobno u tamnom) dodan je XTT (redoks reagens) u kombinaciji s menadionom te je spektrofotometrom očitana apsorbancija pri valnoj duljini 540 nm. Vrijednost MIK-a je određena kao koncentracija ekstrakta propolisa pri kojoj dolazi do redukcije broja gljiva za 80 % (MIK<sub>80</sub>).

Negativna kontrola je sadržavala samo medij i otapalo (bez dodanih mikroorganizama i propolisa), dok je pozitivna kontrola bila izložena djelovanju antibiotika odnosno antimikotika.

#### **3.3.2. ODREĐIVANJE MINIMALNIH KONCENTRACIJA ERADIKACIJE BIOFILMA (MBEK)**

Minimalne koncentracije eradikacije biofilma (MBEK, %) etanolnih ekstrakata propolisa (EEP 1-3) i bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP 1-3) određene su na *S. aureus*, *A. baumannii*, *E. coli* i *C. albicans* kristalviolet (CV) bojenjem. Test se provodi na sterilnim pločama sa 96 jažica



(TPP, Švicarska). U svaku se jažicu stavlja po 100  $\mu$ l bakterijske ( $10^7$  CFU/ml) ili gljivične ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) suspenzije i ispitivane otopine. Kada se testira inhibicija stvaranja gljivičnog biofilma, jažice se pred-tretiraju sa po 250  $\mu$ l PBS-a, dok negativne kontrole sadrže samo bujon. Pozitivne kontrole sadrže standardni antibiotik (gentamicin) ili antimikotik (amfotericin B). Testne pločice se inkubiraju u aerobnim uvjetima tijekom 24 h (bakterije) ili 48 h (gljivice) na 37°C. Nakon inkubacije svaka se jažica ispiri 3 puta sa po 250  $\mu$ l PBS-a, te se jako miješa kako bi se maknule sve nepričvršćene bakterije ili gljivice. Preostale stanice se fiksiraju metanolom (15 min) te se ostave na sušenju preko noći. Na formirani biofilm se nanosi boja kristalviolet (1%, 5 min), a višak boje se ispiri ispod vode iz slavine te se ploče ostavljaju sušiti tijekom 24 h na sobnoj temperaturi. Zaostala boja se otapa octenom kiselinom (33 %, v/v). Optička gustoća u svakoj jažici se mjeri Multiscan čitačem mikrotitarskih ploča na 570 nm. MBEK vrijednost predstavlja najveće razrjeđenje ispitivane otopine na kojoj mikroorganizmi ne rastu.

### **3.4. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA PROPOLISA**

Antioksidativni učinak ekstrakata propolisa mjerio se na Zavodu za sudsko i upravno veterinarstvo Veterinarskog fakulteta, kao sposobnost plazme da reducira željezov (III) ion, te kao sposobnost vezanja radikala DPPH metodom.

#### **3.4.1. METODA ODREĐIVANJA SPOSOBNOSTI PLAZME DA REDUCIRA ŽELJEZOV (III) ION (ENGL. FRAP-FERRIC REDUCING ABILITY OF PLASMA)**

Spektrofotometrijski se izmjerio antioksidativni kapacitet plazme koristeći već opisanu metodu (BENZIE i STRAIN, 1996.) s manjim prilagodbama na format mikrotitarske pločice od 96 jažica. FRAP mjeri sposobnost antioksidansa u uzorku da reduciraju  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  ion. FRAP reagens dobiven je tako da se otopina od 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) i 20 mM  $\text{FeCl}_3$  (željezo(III) klorida) razrjedila u 300 mM natrij acetatnom puferu (pH vrijednost 3.6) u omjeru 1:1:10. Po 20  $\mu$ l ekstrakta propolisa stavljeno je u jažice, nakon čega je dodano 280  $\mu$ l FRAP reagensa. Pločice su uz treskanje inkubirane na 30 min i 37°C u mraku. Apsorbancija od 590 nm je očitana na čitaču mikropločica  $\mu$ Quant (Biotec Inc.). Željezov sulfat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) je korišten za izradu kalibracijske krivulje u rasponu od 20-200  $\mu\text{mol/l}$ . Svi su rezultati izraženi kao  $\text{Fe}^{2+}$  ekvivalenti ( $\text{Fe}^{2+}$   $\mu\text{mol}$ ), a testovi su izrađeni u triplicatu.

#### **3.4.2. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI VEZANJA RADIKALA DPPH METODOM**

Metoda DPPH (2, 2-difenil-1- pikrilhidrazil) je metoda vezanja slobodnih DPPH radikala. Sposobnost vezanja radikala određena je prema prethodno opisanoj metodi (VALENCIA i sur.,

2012.) na mikrotitarskim pločicama. U 50  $\mu$ L ekstrakta propolisa dodano je 50  $\mu$ L DPPH (c(DPPH)= 100  $\mu$ mol/mL u apsolutnom etanolu). Kao negativna kontrola korišten je etanol, a kao pozitivna kontrola 10 mg/ml  $\alpha$ -tokoferola. Nakon inkubacije od 30 min u mraku, na sobnoj temperaturi, promjena apsorbancije očitana je na 517 nm na čitaču  $\mu$ Quant (Biotec Inc.). Sva mjerenja rađena su u triplikatu. Rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub>, odnosno kao koncentracija antioksidansa koja uzrokuje 50% inhibicije DPPH. Niža vrijednost IC<sub>50</sub> predstavlja veću učinkovitost antioksidansa. Postotak vezanja radikala računa se prema izrazu  $[(\text{Apsorbancija}_{\text{kontrola}} - \text{Apsorbancija}_{\text{propolis}}) / \text{Apsorbancija}_{\text{kontrola}}] \times 100$ .

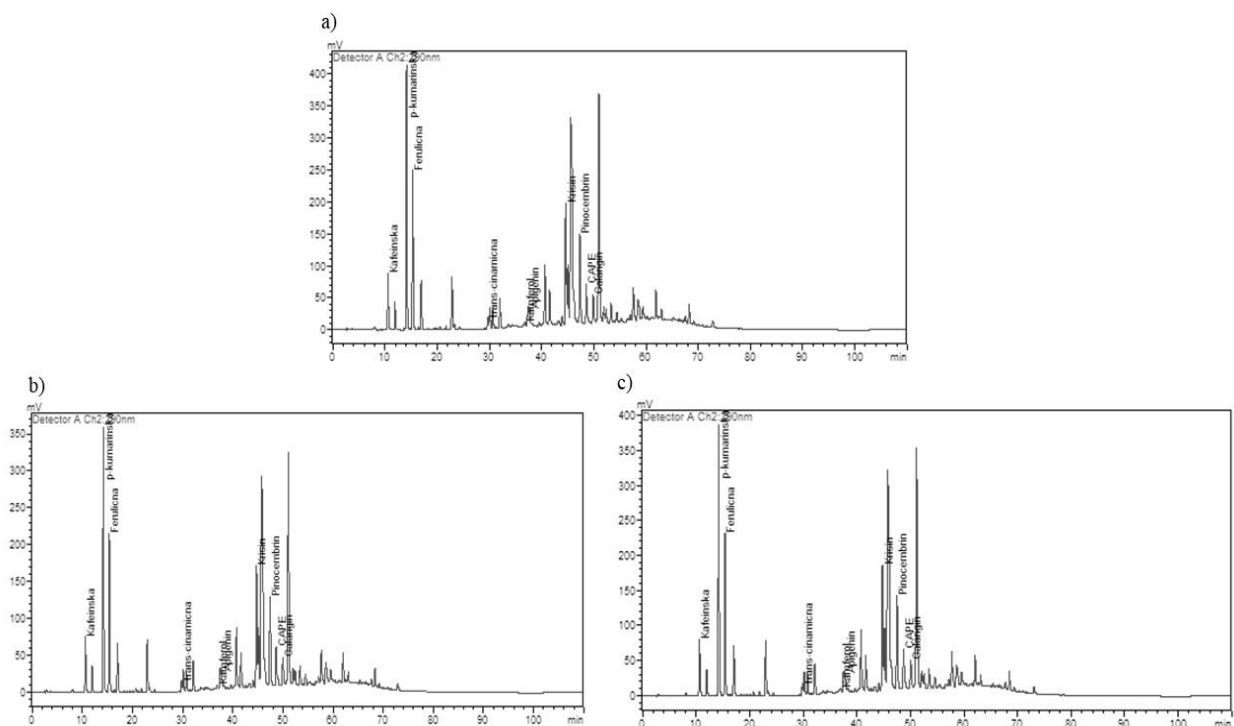
### **3.5. STATISTIČKA ANALIZA**

Rezultati su obrađeni statistički korištenjem računalnog programa Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 8 i prikazani su grafički i tabelarno, kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije (SV  $\pm$  SD) koncentracije biomarkera, te antimikrobnog (MIK, MBEK) i antioksidativnog učinka (IC<sub>50</sub>  $\mu$ g/ml, Fe<sup>2+</sup>  $\mu$ mol) etanolnih ekstrakata propolisa (EEP 1-3) i bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP 1-3).

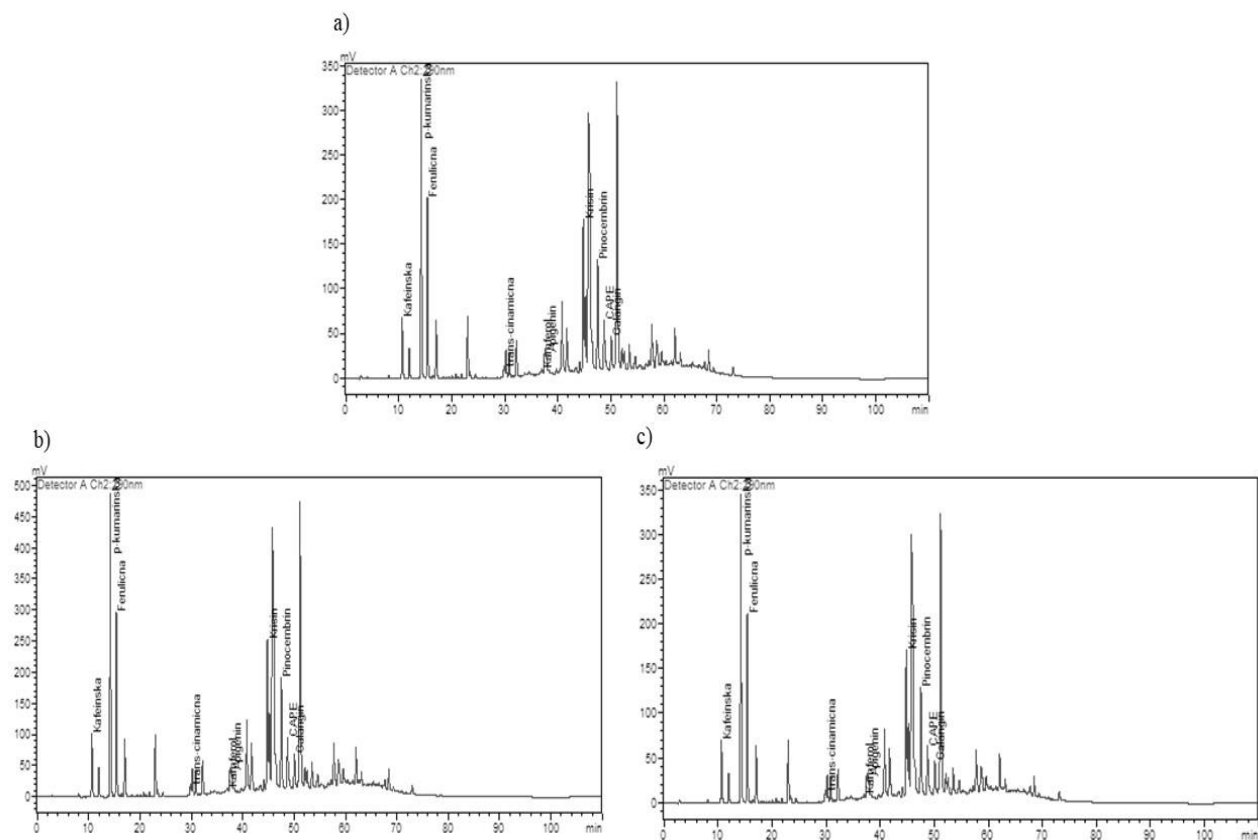
## 4. REZULTATI

### 4.1. ANALIZA EKSTRAKATA PROPOLISA HPLC-UV-VIS-OM

Na slici 1. su prikazani kromatogrami etanolnih ekstrakata propolisa (EEP), od EEP 1 do EEP 3, a na slici 2. kromatogrami bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP), od BEP 1 do BEP 3. Na njima su vidljivi pikovi 10 biomarkera propolisa: kavene kiseline, CAPE, *p*-kumarinske kiseline, *trans*-ferulinske kiseline, pinocembrina, *trans*-cimetne kiseline, galangina, kempferola, apigenina i krizina, čija su vremena zadržavanja prikazana u tablici 2. Na slici 3. je prikazan odnos koncentracija biomarkera u svim otopinama ekstrakta propolisa.



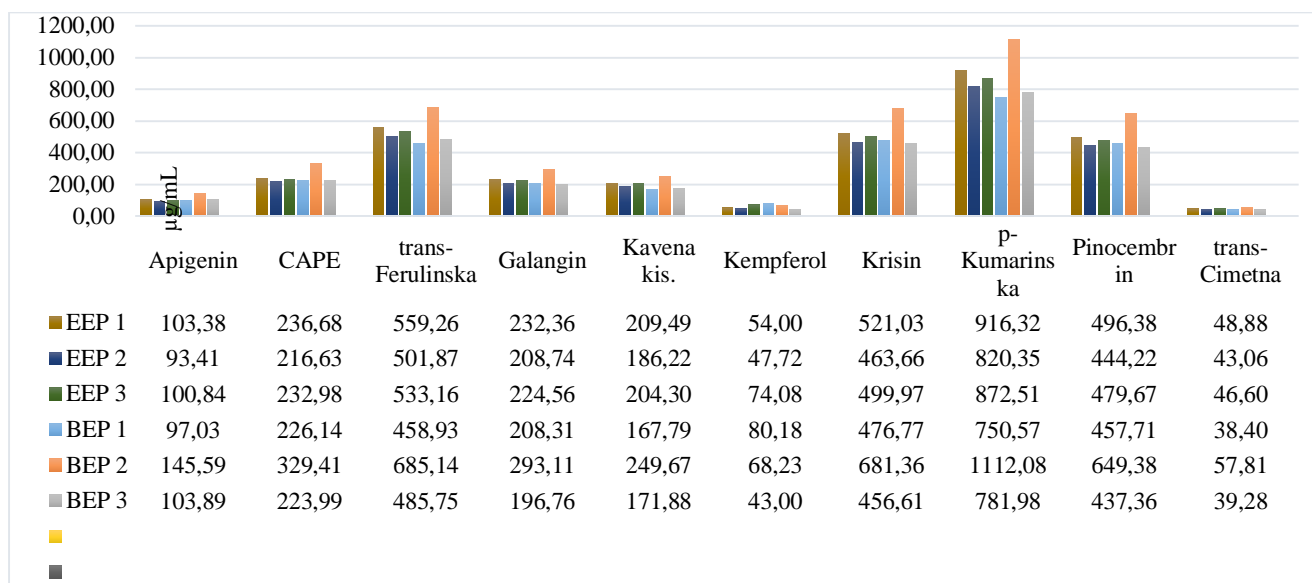
Slika 1. Kromatogrami 10 spojeva utvrđenih u etanolnim ekstraktima propolisa (EEP) na HPLC-UV-VISu: a) EEP 1, b) EEP 2, c) EEP 3



Slika 2. Kromatogrami 10 spojeva utvrđenih u bezalkoholnim ekstraktima propolisa (BEP) na HPLC-UV-VISu: a) BEP 1, b) BEP 2, c) BEP 3

Tablica 2. Vremena zadržavanja (retencije -  $t_R$ ) pojedinih biomarkera propolisa

Br.	Biomarker	Retencijsko vrijeme ( $t_R$ )[min]
1	kavena kiselina	10,57
2	<i>p</i> -kumarinska kiselina	14,13
3	<i>trans</i> -ferulinska kiselina	15,31
4	CAPE	48,62
5	<i>trans</i> -cimetska kiselina	29,76
6	krizin	44,68
7	pinocembrin	47,39
8	galangin	49,94
9	apigenin	37,72
10	kempferol	36,87



Slika 3. Zastupljenost biomarkera u alkoholnim otopinama ekstrakta propolisa (otopine EEP1-3) i u bezalkoholnim otopinama ekstrakta propolisa (otopine BEP1-3). U tablici su navedene koncentracije u  $\mu\text{g/ml}$ .

U obje vrste otopina, p-kumarinska kiselina najzastupljeniji je mjereni biomarker (916,32 – 1112,08  $\mu\text{g/ml}$ ), zatim slijede trans-ferulinska kiselina (559,26 – 685,14  $\mu\text{g/ml}$ ), krisin (521,03 – 681,36  $\mu\text{g/ml}$ ), dok su najmanje koncentracije u obje vrste otopina imali kempferol (74,08 – 80,18  $\mu\text{g/ml}$ ) i trans-cimetna kiselina (48,88 – 57,81  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.2. ANALIZA ANTIMIKROBNOG UČINKA EKSTRAKATA PROPOLISA

Minimalne inhibicijske koncentracije (MIK<sub>80</sub>) otopina propolisa su prikazane u tablici 3. u obliku udjela sirovine. Minimalne koncentracije eradikacije biofilma (MBEK, %) prikazane su u tablici 4.

Tablica 3. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIK<sub>80</sub>) ekstrakata propolisa

MIK (%)	EEP 1 (7)	EEP 2 (8)	EEP 3 (17)	BEP 1 (14)	BEP 2 (9)	BEP 3 (16)
<i>S. aureus</i> ATCC 29293	0,630	0,336	0,755	2,150	0,495	0,268
<i>MRSA</i> MFBF collection	1,26	0,336	0,755	2,15	0,495	0,134
<i>MSSA</i> MFBF collection	0,48	0,337	0,755	2,15	0,385	0,241
<i>E. faecalis</i> ATCC 9212	2,52	2,69	3,02	12,42	1,98	2,14
<i>E. faecalis</i> VRE MFBF collection	>25	10,17	14,57	21,5	9,74	2,14
<i>E. coli</i> ATCC 10536	2,52	0,782	1,12	1,98	1,540	0,535
<i>A. baumannii</i> ATCC 43498	1,26	0,673	0,755	2,15	0,99	0,535
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	>25	>26	>30,2	>21,5	10,74	10,76
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>25,2	2,69	>30,2	>21,4	1,54	1,07

Tablica 4. Minimalne koncentracije eradikacije biofilma (MBEK, %) ekstrakata propolisa

MBEK (%)	EEP 1 (7)	EEP 2 (8)	EEP 3 (17)	BEP 1 (14)	BEP 2 (9)	BEP 3 (16)
<i>S. aureus</i> ATCC	0,630	26,336	5,755	2,150	10,495	0,268
<i>E. coli</i>	2,52	26,782	10,12	1,98	10,540	0,535
<i>A. baumannii</i>	1,26	26,673	3,755	2,15	10,99	0,535
<i>C. albicans</i>	>25,2	>26,9	>30,2	>21,4	>19,8	1,07

### 4.3. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA PROPOLISA

Sposobnost plazme da reducira željezov (III) ion (engl. FRAP-Ferric reducing ability of plasma) i sposobnosti vezanja radikala DPPH metodom nakon dodavanja EEP-a i BEP-a, prikazane su u tablici 5. Rezultati DPPH testa nam pokazuju koncentraciju antioksidansa koja je potrebna za inhibiciju 50 % DPPH, a rezultati FRAP testa nam pokazuju koliko je mmola Fe<sup>3+</sup> iona reducirano u Fe<sup>2+</sup> ione.

Tablica 5. Srednje vrijednosti (SV) i standardne devijacije (SD) sposobnosti vezanja slobodnih radikala (DPPH) i reduciranja iona željeza, odnosno antioksidativnog kapaciteta plazme (FRAP) etanolnih ekstrakata propolisa (EEP) i bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP)

	DPPH		FRAP	
	IC <sub>50</sub> μg/ml	SD	Fe <sup>2+</sup> μmol	SD
EEP 1	13,5	0,86	40,37	0,91
EEP 2	13,8	1,39	42,38	1,56
EEP 3	12,83	1,13	39,75	2,25
BEP 1	11,71	1,34	41,03	1,28
BEP 2	15,71	0,94	40,46	0,75
BEP 3	11,89	0,71	43,24	0,97

Najbolji antioksidativni učinak od etanolnih ekstrakata prema DPPH testu imala je otopina EEP 3, a prema FRAP testu EEP 2. Od bezalkoholnih ekstrakata u DPPH testu je najveći antioksidativni učinak imao BEP 1, a u FRAP testu BEP 3.

## 5. RASPRAVA

Biljni izvori, koji su isprva bili korišteni kao ljekoviti pripravci narodne medicine, a nakon što je njihova efikasnost bila testirana i potvrđena, usvojeni od strane konvencionalne zapadne medicine, predstavljaju glavnu sirovinu u nastanku pčelinjih proizvoda. Sve do sada, više od 300 kemijski aktivnih spojeva, od kojih su najistaknutiji flavonoidi, fenoli i aromatični spojevi, identificirano je u propolisu, što njegov kemijski sastav čini veoma kompleksnim (MIZRAHI i LENSKY, 2013.). Pri izradi otopine ekstrakta propolisa, koriste se različita alkoholna i bezalkoholna otapala, a upotreba istih može izlučiti različite kemijski aktivne spojeve, utječući na njegovu aktivnost (CUNHA i sur., 2004.). Proizlazeći iz navedenog, vidljivo je da sastav i učinkovitost ekstrakta propolisa ovise o izboru otapala prilikom ekstrakcije (BUENO-SILVA i sur., 2013.).

Glavni korak u procesu ispitivanja svojstava propolisa jest ekstrakcija njegovih uzoraka. Prije ekstrakcije, potrebno je sprovesti makroskopski pregled uzoraka, koji vrlo često u sirovom obliku sadrže primjese poput komada drveta, pčelinjeg voska i peluda, pa čak i mrtvih pčela, kako bi se primjese uklonile, a uzorak pročistio. Propolis posjeduje različite biološke aktivnosti, a iste se pripisuju jednoj od njegovih glavnih sastavnica, razredu fenola, posebice flavonoidima i fenol-karboksilnim kiselinama i njihovim esterima (RUSAK, 2008.). Stoga je vrlo bitno odabrati pravilnu metodu ekstrakcije, koja će sačuvati fenolnu frakciju, a samim time i bioaktivnost propolisa. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala se kao slabije pouzdana metoda, posebice u slučaju ekstrakcije uzoraka bogatih fenolima, čiji se udio smanjuje zbog djelovanja oksidacijskih procesa na samu fenolnu frakciju (TRUSHEVA i sur., 2007.). Ekstrakcija uzoraka uglavnom se vrši kontinuiranom maceracijom u različitim otapalima. Otapala koja se koriste pri ekstrakciji jesu alkoholi, metanol i etanol, a potonji može sadržavati različit postotak vode, te se javlja u 70 %-tnom, 80 %-tnom ili 96 %-tnom obliku, te predstavlja najčešće korišteno otapalo pri ekstrakciji (BANKOVA i sur., 2002.). Alkoholna su otapala značajno učinkovitija u ekstrakciji propolisa od bezalkoholnih, a 70 % etanol ekstrahira većinu kemijski aktivnih spojeva propolisa, ali ne i vosak, koji čini 20-30 % njegovog ukupnog sastava (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). Kao bezalkoholna otapala može se koristiti voda, ali sva bezalkoholna otapala ekstrahiraju manji udio propolisa, te gledajući težinu samog uzorka, otope oko 10 % njegove mase, dok etanol otopi 50-70 % mase uzorka propolisa, ovisno o udjelu voska u uzorku. Navedene tvrdnje odgovaraju dobivenim rezultatima u ovom istraživanju, a u svrhu istog izrađene su tri alkoholne i tri bezalkoholne otopine ekstrakta propolisa. Tri otopine etanolnih ekstrakata propolisa imaju viši postotak otopljenog propolisa,



u odnosu na tri otopine izrađene u bezalkoholnom polietilenglikolskom (PEG) otapalu. Uspoređujući tri etanolna ekstrakta propolisa (EEP), treća otopina (EEP3) sadrži najviši postotak otopljenog propolisa, 30,2 %, dok usporedbom bezalkoholnih ekstrakata propolisa (BEP), prva otopina (BEP1) sadrži najviši postotak otopljenog propolisa, 21,5 %.

Istraživanje bioaktivnosti propolisa započinje kemijskim profiliranjem ekstrakata, to jest analizom sastava otopina ekstrakta propolisa. Kemijski sastav takvih otopina omogućuje identifikaciju markera biološke aktivnosti (biomarkera), a prema zastupljenosti istih i listu očekujućih bioaktivnosti. Spektrofotometrija se može koristiti pri brznoj kvantifikaciji biomarkera u otopinama propolisa, kao što je određivanje ukupnog broja flavonoida i fenola (SAWAYA i sur., 2004.). GÓMEZ-CARAVACA i sur. (2006.) predlažu metodu tekućinske kromatografije (HPLC-a) za kvantitativnu i kvalitativnu analizu sastava otopina, posebice analizi razreda fenola. PELLATI i sur. (2013.) su HPLC-om identificirali brojne biomarkere etanolnih ekstrakata, koje su podijelili u dva razreda, razred aromatskih kiselina s pripadajućom kavenom, p-kumarinskom i ferulinskom kiselinom te razred flavonoida s pripadajućim pinocembrinom, apigeninom, kempferolom, galanginom i krizinom. Identificirane tvari odgovaraju onima koje su identificirane u obje vrste otopina u ovom istraživanju, a neke od njih, poput pinocembrina i galangina pokazuju znatnu antimikrobnu aktivnost (BOSIO i sur., 2000.), ali i antioksidacijsku aktivnost poput kempferola i kavene kiseline (HAMASAKA i sur., 2004.), što odgovara rezultatima u ovom istraživanju.

Opća pretpostavka u ovom istraživanju bila je ta da će ekstrakti propolisa s većim postotkom otopljene sirovine, sadržavati i veću koncentraciju biomarkera, odnosno imati bogatiji kemijski profil. Rezultati su pokazali drugačije, te je isto tako pokazano da ne postoji međusobna ovisnost između koncentracije biomarkera i postotka otopljenog propolisa u istoj otopini. Usporedbom EEP-a utvrđeno je da EEP 1, inače s najnižim postotkom otopljenog propolisa sadrži najveću koncentraciju svih 9 biomarkera, osim jednog, kempferola, koji je pokazao najveću zastupljenost upravo u otopini s najvišim postotkom otopljenog propolisa, u EEP3. Svih 9 biomarkera, s odstupanjem kempferola, bilo je isto tako najzastupljenije u BEP2, koji je pokazao najniži postotak otopljenog propolisa, dok je kempferol najzastupljeniji bio u BEP1 s najvišim postotkom otopljenog propolisa.

Najzastupljeniji biomarkera u obje vrste otopina, je p-kumarinska kiselina, a koncentracija iste u EEP1 iznosi 916,32 µg/ml, dok u BEP2 iznosi 1112,08 µg/ml. Trans-ferulinska kiselina kao drugi najzastupljeniji mjereni biomarker pokazala je koncentraciju od 559,26 µg/ml u EEP1, dok u BEP2 pokazuje vrijednost od 685,14 µg/ml. Pretpostavljeno je da će biomarkeri pokazati

veću zastupljenost upravo u EEP (SFORCIN i BANKOVA, 2011.), no u ovom istraživanju dobiveni su različiti rezultati, te je svih 10 identificiranih biomarkera pokazalo veću zastupljenost upravo u BEP. Takve rezultate moguće je objasniti prilikom razmatranja samog postupka ekstrakcije uzoraka. U ovom istraživanju pri ekstrakciji korišten je 70 %-tni etanol, što odgovara standardnim postupcima ekstrakcije (SALOMÃO i sur., 2004.). Pokazalo se da je 60 %-tni etanol najučinkovitije otapalo pri ekstrahiranju flavonoida u najvišim koncentracijama, poput kempferola, dok se pinocembrin ekstrahira u visokoj zastupljenosti pri upotrebi 70 %-tnog etanola (PARK i sur., 1998). Polietilenglikolsko otapalo se pokazalo značajno boljim u ekstrahiranju fenolnih kiselina kao što su p-kumarinska, trans-ferulinska, kavena i ester CAPE, kao što je navedeno u patentu koji opisuje metodu ekstrahiranja i standardizacije koja je korištena u ovom istraživanju (RADIĆ i sur., 2020.).

Obje vrste otopina propolisa različito su djelovale na testirane različite sojeve 8 bakterija te na gljivicu *C. albicans*. Pretpostavka da će najbolji antimikrobni učinak imati ekstrakti s najvišom koncentracijom otopljenog propolisa se pokazala pogrešnom, no opet, bilo je premalo uzoraka da bi se mogla odrediti korelacija koncentracije biomarkera s učincima. Primjerice, ekstrakt EEP2 koji ne sadrži ni najmanji (EEP1) ni najveći (EEP3) postotak otopljenog propolisa, već sadrži najnižu koncentraciju svih 10 biomarkera, imao je najniže  $MIK_{80}$  vrijednosti za 6 bakterija i gljivice ali najvišu MBEK vrijednost (najslabiji učinak) kod 3 testirane bakterije, ali ne i gljivice. EEP1 s najvišom koncentracijom biomarkera, najbolju je aktivnost pokazala samo kod *E. faecalis* ( $MIK_{80}$  iznosi 2,52) i *P. aeruginosa* ( $MIK_{80}$  iznosi >25). EEP3 sa srednjom koncentracijom biomarkera, pokazala je najvišu MBEK vrijednost jedino kod gljivice. BEP3 sa srednjim postotkom otopljenog propolisa (21,4%) i najnižom koncentracijom CAPE-a, galangina, kempferola, krisina i pinocembrina pokazala je najniže  $MIK_{80}$  vrijednosti kod svih bakterija i gljivice, s izuzetkom *E. faecalis* i *P. aeruginosa*, kod kojih je djelotvornija bila BEP2. S druge strane, BEP2 s najmanjim postotkom otopljenog propolisa i najvišom koncentracijom biomarkera, pokazala je najviše MBEK vrijednosti kod 3 testirane bakterije, dok je BEP1 otopina s najvećim postotkom otopljenog propolisa i najnižom koncentracijom određenih biomarkera (apigenin, trans-ferulinska, kavena, p-kumarinska i trans-cimetna kiselina) te najvišom koncentracijom kempferola pokazala najvišu MBEK vrijednost. NIEVA MORENO i sur. (1999.) sugeriraju da EEP pokazuju visok antibakterijski učinak prema gram pozitivnim kokima, no slabije djeluju protiv gram negativnih bakterija i kvasaca. Razlog slabijeg učinka propolisa protiv gram negativnih bakterija moguće je pripisati razvijenoj polupropusnoj vanjskoj membrani ovih bakterija (VIVEIROS i sur., 2007.). MOTIOR RAHMAN i sur.

(2010.) istražili su antibakterijski učinak EEP protiv dvije bakterije, *E. coli* i *S. aureus*. Usporen rast *S. aureus* primijećen je pri koncentraciji propolisa 2,74 – 5,48 mg/ml, dok je potrebna koncentracija propolisa za inhibiciju rasta *E. coli* iznosila 5,48 mg/ml. U ovom istraživanju dvostruko manja vrijednosti MIK<sub>80</sub> za *S. aureus* (0,336) u odnosu na MIK<sub>80</sub> bakterije *E. coli*, (0,782) dobivena je kod otopine EEP2. Usporedbom vrijednosti MIK<sub>80</sub> EEP i BEP, potonji su pokazali niže vrijednosti MIK<sub>80</sub> (osim BEP2). Dobiveni rezultati mogli bi se objasniti većom zastupljenošću određenih biomarkera, poput galangina, za kojeg su CUSHNIE i LAMB (2005.) pokazali da uzrokuje oštećenje stanične membrane bakterijske stanice i posljedični izlazak staničnog sadržaja; ili su pak bogatiji fenolnim kiselinama, koje dovode do denaturacije proteina, poremećaja sinteze peptidoglikana i oštećenja stanične stijenke (DENYER i STEWART,1998.).

Očekivano, ekstrakti su pokazali različit antioksidativni učinak. EEP3 s najvećim postotkom otopljenog propolisa i srednjom koncentracijom 9 biomarkera, s izuzetkom kempferola, koji je upravo u EEP3 najzastupljeniji (12,83 µg/ml). EEP2 sa srednjim postotkom otopljenog propolisa, te najnižom koncentracijom biomarkera ima je najnižu vrijednost od 13,8 µg/ml. U FRAP testu je EEP2 imao najbolji antioksidativni učinak (42,38 Fe<sup>2+</sup> µmol), dok je najlošiji učinak pokazao EEP3 (39,75 Fe<sup>2+</sup> µmol). BEP1 je pokazao najbolji antioksidativni učinak u DPPH testu (11,71 µg/ml), dok je BEP2 pokazao najlošiji učinak (15,71 µg/ml). BEP1 sadrži najviše otopljenog propolisa, dok su koncentracije određenih biomarkera (apigenin, trans-ferulinska, kavena, p-kumarinska i trans-cimetna kiselina) najniže, srednje (CAPE, galangin, krisin, pinocembrin) ili najviše (kempferol) vrijednosti. BEP2 sadrži najmanje otopljenog propolisa i najvišu koncentraciju biomarkera, izuzevši kempferol, čija je koncentracija u ovoj otopini srednje vrijednosti. BEP3 je pokazao najjači antioksidativni učinak (43,24 Fe<sup>2+</sup> µmol) na FRAP testu, a to je otopina sa srednjom vrijednosti otopljenog propolisa (21,4 %) i srednjom koncentracijom određenih biomarkera (apigenin, trans-ferulinska, kavena, p-kumarinska i trans-cimetna kiselina) te najnižom vrijednosti CAPE-a, galangina, krisina, kempferola i pinocembrina. FRAP testom BEP2 pokazao je najlošiji učinak (40,46 Fe<sup>2+</sup> µmol), iako ima najvišu koncentraciju biomarkera, osim kempferola, te najniži postotak otopljenog propolisa. U ovom istraživanju BEP u odnosu na EEP, općenito su pokazali bolji antioksidativni učinak (osim BEP2) u oba testa. REIS i sur. (2019.) proveli su istraživanje antioksidativnog učinka na etanolnim ekstraktima brazilskog crvenog propolisa, te su dobiveni rezultati veoma slični onima u ovom istraživanju. Najbolju DPPH vrijednost (47,42 µg/ml) pokazao je upravo onaj uzorak propolisa sa srednjom koncentracijom i fenola i flavonoida. NAKAJIMA i sur. (2009.)

proveli su istraživanje na EEP i BEP ispitujući njihov antioksidativni učinak, te su zaključili da je učinkovitiji upravo BEP, čija je sposobnost vezanja pojedinih slobodnih radikala, bila i do 10 puta jača (0,24 (0,15–0,34)  $\mu\text{g/ml}$ ), nego ona koju je pokazao EEP (2,48 (1,65–4,05)  $\mu\text{g/ml}$ ). Navedeni autori pripisali su takav rezultat BEP-a kao posljedicu visoke zastupljenosti kavene kiseline u ovim uzorcima, a istu činjenicu napominju i drugi autori (MISHIMA i sur., 2005.), koji isto tako izvještavaju o skoro pa dvostruko manjoj zastupljenosti kavene kiseline u EEP-a, u odnosu na BEP-a. P-kumarinska kiselina najzastupljeniji je biomarker u EEP-a, no pokazuje slabiji antioksidativni učinak, dok kavena kiselina, kao derivat cimetine kiseline, i prema GULCINU (2006.) pokazuje snažna antioksidativna svojstva.

Od svih biomarkera izmjerenih u ekstraktima, jedino je koncentracija kempferola donekle pratila antimikrobni učinak – ekstrakti koji su imali više kempferola su imali bolji antimikrobni učinak. Značajne razlike u koncentracijama kemijski aktivnih spojeva, utječući na bolje, odnosno lošije iskazivanje učinaka, identificirane su u EEP-a i BEP-a u ovom istraživanju, a navedeno je potvrdilo činjenicu da propolis predstavlja kompleksnu mješavinu više stotina aktivnih tvari, a kvaliteta ekstrakcije istih ponajviše ovisi o izboru metode same ekstrakcije i izboru otapala. Mnoge su studije istraživale utjecaj različitih čimbenika na kemijski sastav propolisa, odnosno na njegovu bioaktivnost. Početna pretpostavka o boljim biološkim učincima ekstrakata s višim koncentracijama biomarkera pokazala se pogrešnom. Čini se da su najbolje biološke učinke imali ekstrakti s optimalnim, ni najvišim, niti najnižim koncentracijama biomarkera. Naravno, ta optimalna zastupljenost ovisit će o metodi ekstrakcije i odabiru otapala (JUG i sur., 2014.). Stoga, iako je etanolna ekstrakcija najčešće korištena metoda, ona ostvaruje malene prinose (engl. *yield*) u ekstrakciji pojedinih spojeva, dugotrajna je, a samim time i ekonomski neisplativa (COTTICA i sur., 2015.), te se predlaže, da se uz upotrebu opisane konvencionalne metode, koriste i novije metode, s manje agresivnim otapalima, a povećanom učinkovitosti ekstrakcije aktivnih tvari, poput ultrazvučno potpomognute ekstrakcije uzoraka (TADDEO i sur., 2016.), te korištenjem novih, inovativnih otapala (RADIĆ i sur., 2020.).

## 6. ZAKLJUČCI:

1. Propolis predstavlja kompleksnu mješavinu više stotina aktivnih tvari, a uspjeh ekstrakcije istih ponajviše ovisi o izboru metode same ekstrakcije i izboru otapala.
2. Tri EEP-a pokazuju viši postotak otopljenog propolisa, u odnosu na tri BEP-a. Treća otopina (EEP3) pokazuje najviši postotak otopljenog propolisa, 30,2 %, dok je najviše otopljenog propolisa, 21,5 % u prvoj otopini (BEP1).
3. U svim ekstraktima (EEP i BEP) izmjerene su koncentracije 10 markera biološke aktivnosti (biomarkera): apigenin, CAPE, trans-ferulinska kiselina, galangin, kavena kiselina, kempferol, krisin, p-kumarinska kiselina, pinocembrin, trans-cimetna kiselina.
4. Nije utvrđena povezanost koncentracije biomarkera u otopini s najvišim postotkom otopljenog propolisa. Prva otopina (EEP1) sadrži najvišu koncentraciju svih 9 određivanih biomarkera, osim kempferola, iako ima najniži postotak otopljenog propolisa. Svih 9 biomarkera, s odstupanjem kempferola, bilo je najzastupljenije u BEP2, koji je pokazao najniži postotak otopljenog propolisa.
5. U obje vrste otopina (EEP i BEP) najzastupljeniji biomarkeri jesu p-kumarinska kiselina i trans-ferulinska kiselina, dok su kempferol i trans-cimetna kiselina najmanje zastupljeni.
6. Koncentracija najzastupljenijih biomarkera veća je u BEP-a, nego u EEP-a. Koncentracija p-kumarinske kiselina u EEP1 iznosi 916,32 µg/ml, dok u BEP2 iznosi 1112,08 µg/ml. Trans-ferulinska kiselina kao drugi najzastupljeniji mjereni biomarker pokazala je koncentraciju od 559,26 µg/ml u EEP1, dok u BEP2 pokazuje vrijednost od 685,14 µg/ml.
7. Najbolji antimikrobni učinak (najniže vrijednosti MIK<sub>80</sub> i MBEK) ima bezalkoholni ekstrakt BEP3. Najslabiji antimikrobni učinak imao je ekstrakt BEP1 (bez dodatka emulgatora).
8. U ovom istraživanju BEP u odnosu na EEP otopine, općenito su pokazale bolji antioksidativni učinak (osim BEP2).

## 7. POPIS LITERATURE

1. ADAMCZAK, A., M. OZAROWSKI, T. M. KARPINSKI (2020): Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *J Clin Med.* 9, 109.
2. ALI, N., S. RASHID, S. NAFEES, S. K. HASAN, S. SULTANA (2014): Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 385, 215-223.
3. ALMEIDA – MURADIAN, L. B., L. C. PAMPLONA, S. COIMBRA, O. M. BARTH (2005): Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis.* 18, 105-111.
4. AMINOV, R. I. (2010): A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol.* 1, 134.
5. BANKOVA, V. (2005a): Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. of Ethnopharmacol.* 100, 114–117.
6. BANKOVA, V. (2005b): Recent trends and important developments in propolis research. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2, 29-32.
7. BANKOVA, V., M. POPOVA, B. TRUSHEVA (2014): Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal.* 8.
8. BANKOVA, V., M. POPOVA, S. BOGDANOV, A. SABATINI (2002): Chemical composition of European propolis: Expected and unexcepted results. *Z. Naturforsch.* 57, 530-533.
9. BANSKOTA, A. H., Y. TEZUKA, S. KADOTA (2001): Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research.* 15, 561-571.
10. BARTLETT, J. G., D. N. GILBERT, B. SPELLBERG (2013): Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis.* 56, 1445–1450.
11. BENZIE, I., J. STRAIN (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry.* 239, 70-76.
12. BEZERRA, G., M. PEREIRA, E. OSTROSKY, E. BARBOSA, M. MOURA, M. FERRARI, C. ARAGAO, A. GOMES (2017): Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. *J Therm Anal Calorim.* 127, 1683-1691.

13. BHAGWAT, S., D. B. HAYTOWITZ, J. M. HOLDEN (2011): USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture. 1, 1-156.
14. BO, G. (2000): Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. *Clin Microbiol Infect.* 6, 6–9.
15. BOGDANOV, S. (2015): Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. Bee Product Science, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
16. BOGDANOV, S., V. BANKOVA (2017): The Propolis Book, Chapter 1: Propolis: Origin, Production, Composition. Bee Product Science, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)
17. BOSIO, K., C. AVANZINI, A. D'AVOLIO, O. OZINO, D. SAVOIA (2000): In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 174-177.
18. BOUZA, E., E. CERCENADO (2002): Klebsiella and enterobacter: antibiotic resistance and treatment implications. *Semin Respir Infect.* 17, 215-230.
19. BUENO – SILVA, B., S. M. ALENCAR, H. KOO, M. IKEGAKI, G. V. SILVA, M. H. NAPIMOGA, P. L. ROSALEN (2013): Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem.* 61, 4546–4550.
20. CHAN, G. C., K. W. CHEUNG, D. M. SZE (2013): The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology.* 44, 262-273.
21. CHEN, Y. L., S. T. HUANG, F. M. SUN, Y. L. CHIANG, C. J. CHIANG, C. M. TSAI, C. J. WENG (2011): Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43, 188-194.
22. CONTI, B. J., M. C. BUFALO, M. d. A. GOLIM, V. BANKOVA, J. M. SFORCIN (2013): Cinnamic Acid Is Partially Involved in Propolis Immunomodulatory Action on Human Monocytes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, 109864.
23. COTTICA, M., H. SABIK, C. ANTOINE, J. FORTIN, N. GRAVELINE, J. V. VISENTAINER, M. BRITTEN (2015): Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *WT - Food Science and Technology.* 60, 609-614.
24. CUNHA, I. B. S., A. C. H. F. SAWAYA, F. M. CAETANO, M. T. SHIMIZU, M. C. MARCUCCI, F. T. DREZZA, G. S. POVIA, P. DE O. CARVALHO (2004): Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 964-970.

25. CUSHNIE, T. P. T., A. J. LAMB (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 26, 343-356.
26. CUSHNIE, T. P. T., A. J. LAMB (2005): Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26, 343-356.
27. CUSHNIE, T. P. T., A. J. LAMB (2005): Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol*. 101, 243-248.
28. CUSHNIE, T. P. T., A. J. LAMB (2011): Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 38, 99-107.
29. DAI, J., R. J. MUMPER (2010): Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15, 7313-7352.
30. DAUGSCH, A., C. S. MORAES, P. FORT, Y. K. PARK (2008): Brazilian Red Propolis: Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 5, 435-441.
31. DENISOW, B., M. DENISOW – PIETRZYK (2016): Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96, 4303-4309.
32. DENYER, S. P., G. S. A. B. STEWART (1998): Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41, 261-268.
33. DONG, J., J. QIU, J. WANG (2013): Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. *FEMS Microbiology Letters*. 338, 124-131.
34. ESCRICHE, I., M. JUAN-BORRAS (2018): Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Res. Int*. 106, 834-841.
35. EUMKEB, G., S. CHUKRATHOK (2013): Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*. 20, 262-269.
36. FALZON, C.C., A. BALABANOVA (2017): Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care*. 44, 217-227.
37. FAROOQUI, T., A. FAROOQUI (2010): Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Food Sci*. 6, 188-199.
38. FIRATI, U., S. SENOL, I. GELINCIK, M. KAPAN, O. TOKGOZ, R. TEKIN, O. EVLIYAOGU, A. ONDER, H. ALP (2015): The effects of caffeic acid phenethyl ester(CAPE) on bacterial translocation and inflammatory response in an experimental



- intestinal obstruction model in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19, 1907-1914.
39. FRATELLONE, P. M., F. TISMIS, G. FRATELLONE (2016): Apitherapy Products for Medicinal Use. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 22, 1020-1022.
  40. GOMEZ – CARAVACA, A. M., M. GOMEZ – ROMERO, D. ARRAEZ – ROMAN, A. SEGURA – CARRETERO, A. FERNANDEZ – GUTIERREZ (2006): Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 1220-1234.
  41. GULCIN, I. (2006): Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 217, 213-220.
  42. HAMASAKA, T., S. KUMAZAWA, T. FUJIMOTO, T. NAKAYAMA (2004): Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. *Food Science and Technology Research*. 10, 86-92.
  43. HARBORNE, J. B., C. A. WILLIAMS (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55, 481-504.
  44. HEGAZI, A. G., F. K. ABD EL HADY, F. A. ABD ALLAH: (2000): Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch*. 55, 70-75.
  45. HUANG, S., C.-P. ZHANG, K. WANG, G. Q. LI, F.-L. HU (2014): Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. 19, 19610-19632.
  46. HUDNALL, M. (2007): US Patent 7294351: Composition containing fractionated bee propolis.
  47. ISIDOROV, V. A., L. SZCZEPANIAK, S. BAKIER (2014): Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*. 142, 101-106.
  48. IVANČAJIĆ, S., I. MILEUSNIĆ, D. CENIĆ – MILOŠEVIĆ (2010): In Vitro Antibacterial Activity of Propolis Extracts on 12 Different Bacteria in Conditions of 3 Various pH Values. *Arch. Biol. Sci*. 62, 915-934.
  49. JUG, M., M. ZOVKO KONČIĆ, I. KOSALEC (2014): Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT - Food Science and Technology*. 57, 530-537.
  50. KABERA, J. N., E. SEMANA, A. R. MUSSA, X. HE (2014): Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*. 2, 377-392.

51. KAMPKOTTER, A., C. GOMBITANG NKWONKAM, R. F. ZURAWSKI, C. TIMPEL, Y. CHOVOLOU, W. WATJEN, R. KAHL (2007): Effects of the flavonoids kaempferol, quercetin and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Toxicology*. 81, 849-858.
52. KAWAI, T., S. AKIRA (2009): The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 21, 317-37.
53. KIEWLICZ, J., H. SZYMUSIAK, R. ZIELINSKI (2015): Thermal stability and antioxidant activity of long-chain alkyl esters of ferulic acid. *Zywn Nauk Technol*. 4, 188-200.
54. KOC, A. N., S. SILICI, F. KASAP, H. T. HORMET – OZ, H. MAVUS – BULDU, B. D. ERCAL (2011): Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food*. 14, 128-134.
55. KOSALEC, I., K. SANKOVIĆ, M. ZOVKO, N. ORSOLIĆ, M. BAKMAZ, Z. KALOGJERA, S. PEPELJNJAK (2007): Antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Croatia and Brazil: a comparative study. *Planta medica*. 73, 875.
56. KOT, B., J. WICHA, M. PIECHOTA, K. WOLSKA, A. GRUZEWSKA (2015): Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turk J Med Sci*. 45, 919-924.
57. KROON, P. A., G. WILLIAMSON (1999): Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric*. 79, 355-361.
58. KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, Y. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 235-240.
59. KUMAZAWA, S., T. HAMASAKA, T. NAKAYAMA (2004): Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84, 329-339.
60. LEE, G., H. BAE (2016): Bee Venom Phospholipase A2: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend. *Toxins*. 8, 48.
61. LEESE, H. J., F. GUERIF, V. ALLGAR, D. R. BRISON, K. LUNDIN, R. G. STURMEY (2016): Biological Optimization, the Goldilocks Principle, and How Much Is Lagom in the Preimplantation Embryo. *Mol Reprod Dev*. 83, 748-754.
62. LIGON, B. L. (2004): Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis*. 15, 52–57.

63. LOU, Z., H. WANG, S. RAO, J. SUN, C. MA, J. LI (2012): p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*. 25, 550-554.
64. LOWY, F. D. (2003): Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 111, 1265–1273.
65. MELLIU, E., I. CHINO (2005): Chemistry and Bioactivity of Royal Jelly from Greece. *J. Agric. Food Chem*. 53, 8987-8992.
66. MISHIMA, S., Y. INOH, Y. NARITA, S. OHTA, T. SAKAMOTO, Y. ARAKI, K. M. SUZUKI, Y. AKAO, Y. NOZAWA (2005): Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorg Med Chem*. 13, 5814-5818.
67. MIZRAHI, A., Y. LENSKY (2013): Bee products: properties, applications, and apitherapy. New York: Springer Science & Business Media.
68. MOHR, K. I. (2016): History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol*. 398, 237-272.
69. MORIMOTO, Y., T. BABA, T. SASAKI, K. HIRAMATSU (2015): Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46, 666-673.
70. MOTIOR RAHMAN, M., A. RICHARDSON, M. SOFIAN – AZIRUN (2010): Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*. 4, 1872-1878.
71. NABAVI, S. F., N. BRAIDY, S. HABTEMARIAM ET AL. (2015): Neuroprotective effects of chrysin: from chemistry to medicine. *Neurochem Int*. 90, 224-231.
72. NAKAJIMA, Y., K. TSURUMA, M. SHIMAZAWA, S. MISHIMA, H. HARA (2009): Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9, 4.
73. NAKAJIMA, Y., K. TSURUMA, M. SHIMAZAWA, S. MISHIMA, H. HARA (2009): Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9.
74. NIEVA MORENO, M. I., M. I. ISLA, N. G. CUDMANI, M. A. VATTUONE, A. R. SAMPIETRO (1999): Screening of bacterial activity of Amaicha Del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *J. Ethnopharm*. 68, 97-102.
75. ONLEN, Y., N. DURAN, E. ATIK, L. SAVAS, E. ALTUG, S. YAKAN, O. ASLANTAS (2007): Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism

- with topical mupirocin. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 13, 713-718.
76. PARK, Y. K., M. H. KOO, J. A. S. ABREU, M. IKEGAKI, J. A. CURY, P. L. ROSALEN (1998): Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. *Current Microbiology*. 36, 24-28.
77. PATERSON, D. L. (2006): Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. 34, 20-28.
78. PELLATI, F., F. P. PRENCIPE, D. BERTELLI, S. BENVENUTI (2013): An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 81-82, 126-132.
79. PEPELJNJAK, S., I. KOSALEC (2004): Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 240, 111-116.
80. PEPELJNJAK, S., I. KOSALEC (2004): Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 240, 111-116.
81. PIETTA, P. G., C. GARDANA, A. M. PIETTA (2002): Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. 73, 7–20.
82. PLAYFAIR, J. H. L. (2004): *Living with Germs: In sickness and in health*. Oxford: Oxford University Press.
83. POPOVA, M., B. TRUSHEVA, S. CUTAJAR, D. ANTONOVA, D. MIFSUD, C. FARRUGLA, V. BANKOVA (2012): Identification of the Plant Origin of the Botanical Biomarkers of Mediterranean type Propolis. *Natural Product Communications*. 7, 569-570.
84. POPOVA, M., S. SILICI, O. KAFTANOGLU, V. BANKOVA (2005): Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 12, 221-228.
85. PRESTON, S. L., G. L. DRUSANO (2016): *Penicillins Antimicrobe*. E-Sun Technologies. 1, 8-12.
86. RADIĆ, S., B. RADIĆ, J. ŠURAN (2020.): Liquid propolis extract, its formulation and use thereof. Patent: WO/2020/169425

87. RASTOGI, N., K. S. GOH, L. HORGEN, W. W. BARROW (1998): Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and trans-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 149-157.
88. REIS, J. H. d. O., G. d. A. BARRETO, J. C. CERQUEIRA, J. P. d. ANJOS, L. N. ANDRADE, F. F. PADILHA, J. I. DRUZIAN, B. A. S. MACHADO (2019): Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS ONE.* 14, e0219063.
89. RICE – EVANS, C. (2001): Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry.* 8, 797–807
90. RUSAK, G. (2008): Bioactive constituents of propolis. *Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine.* 2008, 15-31.
91. SALOMAO, K., A. P. DANTAS, C. M. BORBA, L. C. CAMPOS, D. G. MACHADO, F. R. AQUINO NETO, S. L. DE CASTRO (2004): Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology.* 38, 87-92.
92. SAWAYA, A. C. H. F., D. M. TOMAZELA, I. B. S. CUNHA, V. S. BANKOVA, M. C. MARCUCCI, A. R. CUSTODIO, M. N. EBERLIN (2004): Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst.* 129, 739-744.
93. ŞENEL, E., E. DEMIR (2018): Bibliometric Analysis of Apitherapy in Complementary Medicine Literature Between 1980 and 2016. *Complement Ther Clin Pract.* 31, 47-52.
94. SFORCIN, J. M. (2016): Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 30, 894-905.
95. SFORCIN, J. M., V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253-260.
96. SFORCIN, J. M., V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology.* 133, 253-260.
97. SHAWKY, E., R. S. IBRAHIM (2018): Bioprofiling for the quality control of Egyptian propolis using an integrated NIR-HPTLC-image analysis strategy. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1095, 75-86.
98. SIES, H., D. P. JONES (2007): Oxidative stress. *Encyclopedia of stress.* 2, 45-48.

99. SILICI, S., S. KUTLUCA (2005): Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 69-73.
100. SOBOČANEC, S., V. ŠVERKO, T. BALOG, A. ŠARIĆ, G. RUSAK, S. LIKIĆ, B. KUŠIĆ, V. KATALINIĆ, S. RADIĆ, T. MAROTTI (2006): Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 8018-8026.
101. SOROMOU, L. W., Y. ZHANG, Y. CUI, M. WEI, N. CHEN, X. YANG, M. HUO, A. BALDE, S. GUAN, X. DENG, D. WANG (2013): Subinhibitory concentrations of pinocembrin exert anti-*Staphylococcus aureus* activity by reducing  $\alpha$ -toxin expression. *J Appl Microbiol*. 115, 41-49.
102. SZEWCZYK, K., T. KRZACZEK, T. ŁOPATYNSKI, U. GAWLIK – DZIKI, C. ZIDORN (2014): Flavonoids from *Jovibarba globifera* (Crassulaceae) rosette leaves and their antioxidant activity. *Natural Product Research*. 28, 1655-1658.
103. TADDEO, A., F. EPIFANO, S. FIORITO, S. GENOVESE (2016): Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 129, 219-223.
104. TANWAR, J., D. SHRAYANEE, F. ZEESHAN, H. SAIF (2014): Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014:541340.
105. TATSIMO, S. J. N., J. d. D. TAMOKOU, L. HAVYARIMANA, D. CSUPOR, P. FORGO, J. HOHMANN, J. – R. KUIATE, P. TANE (2012): Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferolkaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes*. 5, 158.
106. TAZAWA, S., T. WARASHINA, T. NORO, T. MIYASE (1998): Studies on the constituents of Brazilian propolis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 46, 1477-1479.
107. TLAK GAJGER, I., I. PAVLOVIĆ, M. BOJIĆ, I. KOSALEC, S. SREĆEC, T. VLAINIĆ, J. VLAINIĆ (2017): The components responsible for the antimicrobial activity of propolis from Continental and Mediterranean regions in Croatia. *Czech J. Food Sci*. 35, 376-385.
108. TRUSHEVA, B., D. TRUNKOVA, V. BANKOVA (2007): Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*. 7, 1-13.

109. TURNIDGE, J. (2014): Antibiotic use and resistance; proving the obvious. *The Lancet*. 365, 548–549.
110. UEDA, T., T. ITO, H. KURITA, M. INDEN, I. HOZUMI (2019): p-Coumaric Acid Has Protective Effects against Mutant Copper-Zinc Superoxide Dismutase 1 via the Activation of Autophagy in N2a Cells. *Int J Mol Sci*. 16, 2012-2942.
111. VALENCIA, D., E. ALDAY, R. ROBLES – ZEPEDA, A. GARIBAY – ESCOBAR, J. C. GALVEZ – RUIZ, M. SALAS – REYES, M. JIMENEZ – ESTRADA, E. VELAZQUEZ – CONTRERAS, J. HERNANDEZ, C. VELAZQUEZ (2012): Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*. 131, 645-651.
112. VICTORINO, F. R., S. L. FRANCO, T. I. E. SVIDZINSKI, M. J. AVILA – CAMPOS, R. K. N. CUMAN, M. M. HIDALGO, C. A. BERSANI – AMADO (2007): Pharmacological evaluation of Propolis solutions for endodontic use. *Pharmaceutical Biology*. 45, 721-727.
113. VIVEIROS, M., M. DUPONT, L. RODRIGUES, I. COUTO, A. DAVIN – REGLI, M. MARTINS, J. M. PAGES, L. AMARAL (2007): Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. *PLoS ONE*. 2, e365.
114. WEIWEI, D., A. YUANLONG, H. XIANGDONG, Z. DONGLEI, H. WEI (2018): Protection of Kaempferol on Oxidative Stress-Induced Retinal Pigment Epithelial Cell Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, 1610751.
115. WRIGHT, G. D. (2010): Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*. 13, 589–594.
116. XIAO Z. T., Q. ZHU, H. Y. ZHU (2014): Identifying antibacterial targets of flavonoids by comparative genomics and molecular modeling. *Open J. Genom. Res*. 3,1-8.
117. YING, J., Y. D. JIANG, Y. CHEN, S. SAMUEL, G. H. DU (2011): Electrophysiological effects of pinocembrin on *Aplysia SN/L7* co-cultures. *Chin. Pharm. Bull*. 27, 755-759.
118. ZAFFIRI, L., J. GARDNER, L. H. TOLEDO-PEREYRA (2013): History of antibiotics: from fluoroquinolones to daptomycin (Part 2). *J Invest Surg*. 26, 167–179.
- ZDUNSKA, K., D. AGNIESZKA, A. KOLODZIEJCZAK, H. ROTSZTEJN (2018): Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol*. 31, 332-336.

## 8. SAŽETAK

### ANTIMIKROBNI, ANTIOKSIDATIVNI I IMUNOMODULACIJSKI UČINAK TEKUĆIH EKSTRAKATA PROPOLISA

Cilj ovog istraživanja bio je usporedba koncentracije deset markera biološke aktivnosti (biomarkera) u šest različitih tekućih ekstrakata propolisa, alkoholnih (EEP1-3) i bezalkoholnih (BEP1-3), s antimikrobnim i antioksidativnim učinkom. Koncentracija deset biomarkera utvrđena je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-Vis detektorom (HPLC). U obje vrste otopina (EEP i BEP) najzastupljeniji biomarkeri jesu p-kumarinska i trans-ferulinska kiselina, dok su kempferol i trans-cimetna kiselina najmanje zastupljeni biomarkeri. Koncentracija najzastupljenijih biomarkera veća je u BEP-a, nego u EEP-a. Nije utvrđena povezanost koncentracije biomarkera i postotka otopljenog propolisa u obje vrste tekućih ekstrakata propolisa. Antimikrobni učinak šest ekstrakata propolisa određen je mjerenjem MIK-a i MBEK-a. Najbolji antimikrobni učinak (najniže vrijednosti MIK<sub>80</sub> i MBEK) ima bezalkoholni ekstrakt BEP3. Provođenjem FRAP i DPPH metode određen je antioksidativni učinak ekstrakata propolisa. U ovom istraživanju BEP u odnosu na EEP, općenito su pokazali bolji antioksidativni učinak (osim BEP2).

**ključne riječi:** biomarkeri, etanolni ekstrakt propolisa, bezalkoholni ekstrakt propolisa, antimikrobni učinak, antioksidativni učinak



## **9. SUMMARY**

### **ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND IMMUNOMODULATORY EFFECT OF LIQUID PROPOLIS EXTRACTS**

The aim of this study was to compare the concentration of ten markers of biological activity (biomarkers) in six different liquid propolis extracts, alcoholic (EEP1-3) and non-alcoholic (BEP1-3), with antimicrobial and antioxidant effects. The concentration of ten biomarkers was determined by high performance liquid chromatography with a UV-Vis detector (HPLC). In both types of solutions (EEP and BEP) the most common biomarkers are p-coumaric and trans-ferulic acid, while kaempferol and trans-cinnamic acid are the least represented biomarkers. The concentration of the most common biomarkers is higher in BEPs than in EEPs. No association was found between the biomarker concentration and the percentage of dissolved propolis in both types of liquid propolis extracts. The antimicrobial effect of six propolis extracts was determined by measuring MIK and MBEC. The best antimicrobial effect (lowest values of MIK80 and MBEC) was shown by non-alcoholic extract of BEP3. The antioxidant effect of propolis extracts was determined by performing FRAP and DPPH methods. In this study, BEP compared to EEP, generally showed a better antioxidant effect (except BEP2).

**Keywords:** biomarkers, ethanol propolis extract, non-alcoholic propolis extract, antimicrobial effect, antioxidant effect

## 10. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Jana Rak. Rođena sam 10. 06. 1995. godine u Zagrebu, gdje sam završila XVI. gimnaziju 2013. godine, te iste upisala Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom školovanja na imenovanom fakultetu započeo se je razvijati moj interes prema laboratorijskom radu i znanosti. Kako bih stekla što više iskustva i usavršila se u radu u tako kompleksnom području prijavila sam se na izradu grupnog studentskog znanstevnog rada na Zavodu za farmakologiju, od kuda sam bila usmjerena na Institut Ruđer Bošković gdje sam krenula volontirati u Laboratoriju za naprednu genomiku, Zavoda za molekularnu medicinu na navedenom institutu. Tijekom volontiranja sudjelovala sam u nastanku dva studentska znanstveno – istraživačka rada, grupnom radu „Biomarkeri propolisa i njihova povezanost s antimikrobnim i antioksidacijskim učinkom“ te u izradi samostalnog rada, ujedno i diplomskog rada „Antimikrobni, antioksidacijski i imunomodulacijski učinak tekućih ekstrakata propolisa“. Prisustvovala sam na nekoliko kongresa usko vezanih uz područje biomedicine i zdravstva te farmacije, gdje me je iskustvo ostalih sudionika i prezentora neopisivo oduševilo te proširilo moje vidike. Riječ je o „9. Hrvatskom kongresu farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem“ te „8. Međunarodnom kongresu Veterinarske znanosti i struke“, a na potonjem sam sudjelovala u radionici „Izolacija stanica u gradijentu gustoće i određivanje masnokiselinskog sastava membrana“ na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.