Učinak ekstrakata propolisa na markere cijeljenja rana u staničnoj kulturi keratinocita

Sertić, Sunčica

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:420856

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Zavod za farmakologiju i toksikologiju

Institut Ruđer Bošković

SUNČICA SERTIĆ

Učinak ekstrakata propolisa na markere cijeljenja rana u staničnoj kulturi keratinocita

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Jelena Šuran

dr. sc. Josipa Vlainić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

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

Predstojnika zavoda:

prof. dr .sc. Frane Božić

Mentorice:

izv. prof. 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. Izv. prof. dr. sc. Jelena Šuran
4. Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger (zamjena)

ZAHVALA

Iznimna zahvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jeleni Šuran što je prepoznala moju želju za učenjem i napredovanjem u znanstvenoj sferi. Zahvaljujem se što mi je otvorila „vrata“ znanosti i pružila mi priliku za napredovanjem u području farmakologije na Institutu Ruđer Bošković. Neizmjerno sam joj zahvalna na podršci, posvećenosti i ljubaznosti pri izradi diplomskog rada. Hvala cijelom Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta.

Veliko hvala komentorici dr. sc. Josipi Vlainić na ukazanom povjerenju i prilici za radom u Laboratoriju za naprednu genomiku, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Zahvaljujem se na svakom savjetu, dijeljenju znanja te pomoći u istraživanjima. Hvala svim djelatnicima Laboratorija za naprednu genomiku na pozitivnoj atmosferi u laboratoriju i brojnim mogućnostima za učenje.

Veliko hvala dr. sc. Ladi Radin na brojnoj suradnji u projektu SOFTVETS.

Najveće hvala mojoj obitelji - majci Đurđici, ocu Dragi, sestri Hermini i mom dečku Mateju na bezuvjetnoj ljubavi i podršci. Veliko hvala mome Mateju na ljubavi, velikoj podršci i poticanju.

Posebno se zahvaljujem mojoj majci Đurđici na posebnoj ljubavi, velikom odricanju, potpori i bodrenju tijekom svakog ispita u ovih 6 godina. Svaki moj daljnji znanstveni uspjeh posvećen je mojoj majci Đurđici.

Popis kratica:

AQP3- akvaporin

BAPTA-AM- unutarstanični kalcij kelator

BCP- brazilski crveni propolis

BMP -engl. *bone morphogenic protein*- koštani morfogenetski protein

CAPE- fenetil ester kafeinske kiseline

DPP IV -dipeptidil-peptidaza

ECM -ekstracelularni matrix

EFG- engl. *epidermal growth factor* - epidermalni faktor rasta

FGF –engl. *fibroblast growth factor*- faktor rasta fibroblasta

HIF-hipoksijom- inducirani čimbenik

ICAM- engl. Intercellular adhesion molecule - intercelularna međustanična adhezijska molekula

IL-1- interleukin 1

IL-6-interleukin 6

KGF- engl. *keratinocyte growth factor*- keratinocitni faktor rasta

MAPK- mitogen-aktivirana protein kinazu

MCP-1-monocitni kemoatraktant proteina

NF-κB-engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PDGF engl. *platelet-derived growth factor*-trombocitni faktor rasta

PLGF -engl. *placenta growth factor*- faktor rasta placente

PRP- plazma bogata trobocitima

RNS- reaktivni dušikovi spojevi

ROS- reaktivni kisikovi spojevi

TCC- kompleks tripeptidnog bakra

TGF-β -engl. *transforming growth factor* –β- transformacijski faktor rasta β

TIMP-1- tkivni inhibitor metaloproteinaze

VCAM-1- engl. vascular adhesion molecule - vaskularna adhezijska molekula

VEGF- vaskularni faktor rasta

SADRŽAJ

1.UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 3

2. 1. CIJELJENJE RANE 3

2.1.1. HEMOSTAZA 3

2.1.2. UPALNA FAZA 4

2.1.3. PROLIFERACIJSKA FAZA I FAZA REMODELACIJE 5

2.1.4. KORIŠTENJE HaCaT STANIČNE KULTURE U *IN VITRO* MODELIMA CIJELJENJA RANA 7

2.2. MODULATORI CIJELJENJA RANA 8

2.2.1. TRADICIONALNE METODE I PRIPRAVCI ZA CIJELJENJE RANA 9

2.3. PROPOLIS 10

2.3.1. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE PROPOLISA 11

2.3.2. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK PROPOLISA 12

2.3.3. UTJECAJ PROPOLISA NA MASTOCITE TIJEKOM CIJELJENJA RANA 12

2.3.4.PROTUUPALNI UČINAK PROPOLISA 13

2.3.5. *IN VITRO* ISPITIVANJA UČINAKA PROPOLISA NA PROCESE CIJELJENJA RANA. 13

3.1. IZRADA OTOPINA EKSTRAKTA PROPOLISA 15

3.2. ANALIZA MARKERA U EKSTRAKTU PROPOLISA 15

3.3. BAKTERIOLOŠKI POSTUPCI 16

3.3.1. Izdvajanje bakterija i gljivica- McFarland denzitometar 16

3.3.2. Priprema nasađivanja 16

3.3.3. Priprema LB agra 16

3.4. RAD SA STANIČNOM KULTUROM HaCaT 17

3.5. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI I VARIJABILNOSTI 19

3.6. *SCRATCH* TEST 20

3.7. ODREĐIVANJE INTERLEUKINA-6 21

3.8. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 22

4. REZULTATI 23

4.1. KONCENTRACIJE MARKERA U EKSTRAKTU PROPOLISA 23

4.2. MINIMALNA INHIBICIJSKA KONCENTRACIJA BEZALKOHOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA 24

4.3. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI I VARIJABILNOSTI STANICA 25

4.4. SCRATCH TEST 27

4.5. ODREĐIVANJE INTERLEUKINA 6- IMUNOENZIMNOM METODOM 35
5. RASPRAVA 36
6. ZAKLJUČCI 40
7. LITERATURA 41
8. SAŽETAK 49
9. SUMMARY 50
10. ŽIVOTOPIS 51

Popis priloga i tablica

Tablica 1. Mikrotitarska pločica s 96 jažica tretirana koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa
Tablica 2. Tretiranje koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa (200 000 st./jažica)
Tablica 3. Tretiranje stanica koncentriraniM otopinama ekstrakta propolisa (70 000 st./jažica)
Tablica 4. Mjerenje IL-6 na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica
Tablica 5. Koncentracije markera koji se koriste u standardizaciji ekstrakta propolisa
Tablica 6. MIK ekstrakta propolisa na bakterijskim kulturama
Tablica 7. MIK ekstrakta propolisa na gljivičnim kulturama
Tablica 8. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 1. dan *scratch* testa (nakon tretiranja jažica)
Tablica 9. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 2. dan *scratch* testa
Tablica 10. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 3. dan scratch testa

Slika 1. HaCaT stanična kultura
Slika 2. Nediferencirana HaCaT stanična kultura
Slika 3. Očitavanje rezultata
Slika 4. 70 000 stanica/ jažici
Slika 5. 200 000 stanica/ jažici
Slika 6. HPLC-UV kromatogram ekstrakta propolisa s markerima biološke aktivnosti
Slika 7. Citotoksičnost ekstrakta propolisa na HaCaT staničnoj kulturi
Slika 8. Citotoksičnost ekstrakta propolisa na HaCaT staničnoj kulturi
Slika 9. Usporedba stanicama tretiranih kontrolama i koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa, prvog dana *scratch* testa
Slika 10. Usporedba stanica tretiranih kontrolama i koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa, drugog dana *scratch* testa
Slika 11. Rezultati stanica tretiranih kontrolama, trećeg dana *scratch* testa
Slika 12. Stanična kultura tretirana s kontrolama A, B i C (s lijeva na desno) prvog dana *scratch* testa
Slika 13. Stanična kultura tretirana s kontrolama A, B i C (s lijeva na desno) drugog dana *scratch* testa

Slika 14. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 15. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 16. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 17. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 18. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 19. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 20. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 21. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 22. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 23. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 24. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 25. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 26. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana
Slika 27. IL-6 u jažicama tretiranih kontrolama A, B i C u usporedbi sa staničnim kulturama tretiranim koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa 1., 2. i 3. dan

1.UVOD

1.1 POVIJESNI OSVRT O KORIŠTENJU PROPOLISA

Najraniji zapisi o cijeljenju rana pronađeni su u Egiptu. Stari Egipćani koristili su mješavine meda, životinjske masti, bakra i smola za lokalni tretman rane, te prekrivke za rane koje su izrađivali od biljnih vlakana. Rane su prekrivali životinjskim izmetom, medom i smolom. Korištenje meda zapisano je 1700 godine pr. Kr. Paracelsus odbacuje galensku medicinu i sve funkcije organizma tumači kemijskim procesima koji su jednaki onima u anorganskoj prirodi. Godine 1794. John Hunter opisao je primarno sljepljivanje rubova rane između kojih se pojavljuje manja količina krvavog sekreta te cijeljenje putem upale i adhezije rubova rane. Godine 1840. je nastao temelj razumijevanja cijeljenja rana, odnosno da nastaje celularnim umnažanjem tijekom procesa cijeljenja.

Propolis se koristi u cijeljenju rana od 300. g. pr. Kr. (AŠRAF M. EBU-SEIDA, 2015.). Koristili su ga Egipćani, Grci te Rimljani za liječenje unutrašnjih i vanjskih bolesti. U starom Egiptu koristio se, uz med, za balzamiranje mrtvih, a u novije vrijeme je korišten tijekom Burskog rata za liječenje rana (EL GHISALBERT, 1979.). Aristotel je riječ propolis oblikovao iz grčke riječi *pro* (prije) i *polis* (grad), što znači, "prije grada" ili "branitelj grada". Grčki liječnik Hipokrat uočio je utjecaj propolisa na cijeljenje rana. Nedugo nakon, Rimljani su objasnili djelovanje propolisa na cjelokupni ljudski organizam (MARTINOTTI i RANZATO, 2015.). Za cijeljenje rana koristio se zbog imunomodulatornog, antimikrobnog i protuupalnog učinka. Brojne studije istražuju *in vitro* potencijalne učinke propolisa na cijeljenje. Korištenjem *in vitro* metode zacjeljivanja rane dokazano je da propolis izaziva izrazito povećanje sposobnosti obnavljanja rane keratinocita (EBU –SEIDA, 2015).

Prirodna ljepljiva tvar se sakuplja s različitih biljaka poput topole, breze, bukve, crnogorice ili divljeg kestena (BOSIO i sur., 2000.). Pčele tragačice, ne starije od 15 dana prikupljaju ga te oblikuju miješanjem s pčelinjim voskom, peludom, ali i sekretom submandibularnih žlijezda slinovnica, odnosno pčelinjim enzimima iz sline (SFORCIN, 2016.). Pčele prilikom jednog leta sakupe do 10 mg propolisa. Propolis sadržava više od 300 kemijskih komponenti, a sastav propolisa se razlikuje ovisno o geografskom području, vremenskim uvjetima te vrsti biljaka s kojih je sakupljen. Propolis čini 50% smole i balzama, 30% voska, 10% eteričnih i aromatskih ulja, 5% peludi i 5% nečistoća (BANKOVA i sur., 1999.). Unutar

košnice, propolis ima zaštitnu funkciju od vanjskih nepogoda, ali i antimikrobnu u suzbijanju bakterijskih infekcija. Propolis djeluje protuupalno i imunomodularno te potiče cijeljenje rana. Glavne kemijske komponente propolisa su polifenoli koje dijelimo na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi su flavon krizin, flavon galangin i flavonski pinocembrin. Neflavonoidi su fenolne kiseline podijeljene na derivate benzojeve kiseline poput galne kiseline i derivate cimetne kiseline kao što je kafeinska, kumarinska, ferulična kiselina. Količina flavonoida se razlikuje ovisno o tipu propolisa. Spojevi flavonoida pridonose farmakološkoj aktivnosti propolisa (BACHIEGA i sur., 2012.). Najbrojnije fenolne kiseline posjeduju snažan antioksidacijski potencijal (MARAŠ, 2012.). Upravo flavonoidi imaju širok spektar bioloških aktivnosti poput protuupalnih, antibakterijskih i antivirusnih učinaka. Flavonoidi sprječavaju peroksidaciju lipida koja je okidač stanične smrti. Fenetil ester kafeinske kiseline (CAPE) djeluje imunosupresivno te inhibira rast bakterija (IVANOVSKA i sur., 1995.), potiče proces zacijeljivanja te ubrzava cijeljenje rane.

Cijeljenje rane je kompleksan proces koji obuhvaća cijeli niz kemijskih i fizioloških događaja na staničnoj i molekularnoj razini. Postoji mnogo čimbenika koji utječu na cijeljenje rana i svojim djelovanjem usporavaju ili prekidaju proces cijeljenja. Neki od njih su prisustvo devitaliziranog tkiva, akumulacija nekrotičnog tkiva, kolonizacija bakterija i povećana količina slobodnih radikala u rani. Veliki problem u cijeljenju rana predstavljaju kronične rane. Kod kroničnih rana postoje različiti poremećaji u rani na staničnoj i molekularnoj razini. Zastoj u cijeljenju moguć je u bilo kojoj fazi cijeljenja rane, a kod kronične rane se najčešće javlja u upalnoj fazi. Zbog poremećaja povećane aktivnosti proteaza dolazi do razgradnje fibronektina koji sudjeluje u remodelaciji ECM-a i faktora rasta. Promjene u stanicama fibroblasta i keratinocita dovode do smanjenog odgovora stanica na faktore rasta i citokine. Razina citokina kod kroničnih rana je smanjena u usporedbi s količinama u akutnim ranama. S obzirom na niske razine citokina dolazi do smanjene migracije keratinocita. Također, infekcije su jedan od bitnih čimbenika u odgođenom cijeljenju rana. Inficirane rane ne cijele zbog ubrzane razgradnje kolagena i usporavanja epitelizacije. Kontinuirano prisustvo bakterija u rani dovodi do oslobađanja endotoksina i stimulacije imunog odgovora domaćina. Dodatno, pri kroničnoj kolonizaciji rane bakterije stvaraju biofilm rezistentan na obrambene mehanizme domaćina i na antibiotike čime se prolongira infekcija rane.

Stoga su modulatori cijeljenja rana koji bi potaknuli brže cijeljenje kroničnih rana, te njihove formulacije u raznim topikalnim oblicima, u fokusu farmaceutske industrije. U dosadašnjim istraživanjima djelovanja propolisa na cijeljenje rana *in vitro* i *in vivo* korišteni su alkoholni ekstrakti propolisa. Budući da alkoholni ekstrakti propolisa nisu prikladni za direktnu topikalnu primjenu, kao ni u pedijatriskim formulacijama i formulacijama za trudnice, svrha ovog istraživanja bila je ispitati djelovanje bezalkoholnog ekstrakta propolisa na parametre cijeljenja rana *in vitro*.

2. PREGLED LITERATURE

2. 1. CIJELJENJE RANE

Rana, lat. *Vulnus* je ozljeda koju obilježava prekid kontinuiteta kože ili sluznice, pri čemu dolazi do djelomičnog ili potpunog oštećenja na dubljim tkivima (VNUK I MATIČIĆ, 2010.). Prekid kontinuiteta tkiva nastaje zbog fizičkog, mehaničkog, toplinskog, kemijskog i drugog djelovanja. Podijeljena je na ogrebotinu i oguljotinu koju karakterizira prekid samo epiderme. Normalan odgovor organizma na ranu jest cijeljenje. Cijeljenjem rane cilj je nadomjestiti oštećeno tkivo vitalnim tkivom te ponovno dovesti do kontinuiteta kože (WALTER i TALBOT, 1996.). Cijeljenje se odvija kroz nekoliko faza koje se pokreću i prekidaju stimulatorima i inhibitorima. Upravo su to faktori rasta, citokini te matriks metaloproteinaze. S obzirom da cijeljenje rana prati upala, česte su infekcije, krvne perfuzije ili sistemske bolesti (HULJEV, 2013.). Faze cijeljenja rana su: hemostaza, upalna faza, proliferativna faza i faza remodelacije.

2.1.1. HEMOSTAZA

Hemostaza se narušava i nastavlja se intrinzična i ekstrinzična koagulacijska kaskada. Tijekom ozljeđivanja pokreće se koagulacijska kaskada koja je rezultat kontrakcije krvnih žila, stvaranja trombocitnog čepa i koagulacije. Odsutstvo faktora XII, IX i Von Willebrandova faktora, prekida normalan slijed staničnih događanja. Vrijeme krvarenja skraćuju vazokonstriktori, a to su tromboksan A2 i prostaglandin 2-α (CLARK i sur., 1989.).

2.1.2. UPALNA FAZA

Upalna faza počinje u trenutku oštećenja te se dijeli na ranu i kasnu upalu. Rana upalna faza započinje neposredno nakon nastanka rane. Međusobno su povezani procesi upale, proliferacije i maturacije. Da bi se omogućila lakša migracija stanica ugrušak se rastapa fibrinolizom. Time se prevenira kompletna opstrukcija krvnih žila. U kasnoj fazi upale α-granule trombocita stimuliraju ulazak upalnih stanica u područje rane. Upalne stanice su neutrofili i makrofazi koji su uključeni u fagocitozu i debridman rane. Glavna morfološka značajka granulocita su zrnca u citoplazmi koja sadrže enzime: neutralne proteaze, lizozime, kisele peroksidaze, mijeloperoksidazu, kolagenazu i laktoferin. Glavna funkcija neutrofila je fagocitoza, oslobađanje enzima i drugih medijatora te kemotaktičnih čimbenika. Eozinofili također odgovaraju na kemotaktične čimbenike kao i neutrofili. Glavni bazični protein neutralizira heparin i ima jak helmintotoksični učinak. Limfociti su uključeni u imunosne reakcije i ključni su medijatori trenutačnog odgovora protutijela i odgođenog odgovora preosjetljivosti. Migriraju u upaljeno područje nakon neutrofila i može ih biti dosta u subakutnoj i kroničnoj fazi upale. Makrofazi su bogat izvor bioloških staničnih regulatora koji su neophodni za inicijaciju i napredak cijeljenja, otpuštaju citokine i faktore rasta te na taj način stimuliraju fibroblaste, keratinocite i endotelne stanice da obnavljaju oštećene krvne žile. Neutrofili i makrofazi odstranjuju oštećeni ekstracelularni matriks.

U početnoj upalnoj fazi rane dolazi do povećanog priljeva trombocita i njihovog kontakta s kolagenom. Trombociti potiču oslobađanje faktora zgrušavanja. Time dolazi do njihove agregacije i nastanka krvnog ugruška. Osnovna uloga krvnog ugruška je zaustavljanje krvarenja te zaštita rane od štetnog djelovanja mikroorganizma. Trombociti čine rezervoar faktora rasta koji se oslobađanju njihovom degranulacijom. Faktori rasta su odgovorni za početak faze proliferacije procesa cijeljenja rana. Trombocitni faktor rasta PDGF (engl. *platelet –derived growth factor*) transformira ostale faktore: TGF (engl. *transforming growth factors*), IGF-1 (engl. *insulin growth factor*), FGF (engl. *fibroblast growth factor*), GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factors*) i EGF (engl. *epidermal growth factor).*

PDGF trombocitni faktori rasta sastoje se od homodimernih ili heterodimetnih faktora rasta. Uključuju PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD. PDGF ima kemotaktičnu ulogu za migraciju upalnih stanica poput fibroblasta, neutrofila i monocita. Dodatno potiče proliferaciju fibroblasta i taloženje izvanstaničnog matriksa (DIAGN i sur., 2016.). *In vitro* metodom dokazana je PDGF stimulacija oslobađanja IGF-a u fibroblastima. Stimuliran fibroblast kontrahira kolagen te inducira brže cijeljenje rana.

PDGF s proupalnim citokinima poput interleukina-1 (IL-1) potiče kemotaksiju neutrofila. Neutrofili oslobađaju enzime, druge medijatore, kemotaktične čimbenike te provode fagocitozu. Monocite mobilizira TGF-β koji je prisutan u području rane. U upalnoj fazi povećana je sinteza TGF-β1 te pridonosi migraciji stanica. Pod kontrolom TGF-β1 su proteaze poput MMP-1, MMP-2, MMP-3 i MMP-9. Proizvodnjom molekula izvanstaničnog matriksa poput kolagena i fibronektina pridonosi se saniranju rane. Diferencijacijom monocita u makrofage nastavlja se fagocitoza preostalih mikroorganizama i propalih stanica. Makrofazi otpuštaju proupalne citokine poput IL-1, IL-6, TNF-α (engl. *tumor necrosis factor-α*). IL-1 doprinosi remodeliranju mezenhimalnog tkiva. Stimulira endotel kapilara stanica na proizvodnju kemokina kao što je MCP-1. Također uzrokuje pojačanu sintezu molekula vaskularnih adhezija poput ICAM-1, VCAM-1 i E- selektina (LOBMANN i sur., 2006.). Pod kontrolom IL-1 je ekspresija matriks metaloproteinaza. Interleukin 6 stimulira većinu proteina akutne faze tijekom upale. Transgeni miševi s nedostatkom IL-6 pokazali su odgođeno cijeljenje rana u odnosu na kontrolne skupine te povećano vrijeme cijeljenja rane (GALLUCCI i sur., 2000.). IL-6 potiče aktivnost keratinocita te kemo-atraktivno utječe na neutrofile. Time potiče brže zacjeljivanje rana.

Djelovanjem IL-1 dolazi do migracije limfocita T. Diferencijacijom Th2 i Th17 uključuje se glavni upalni odgovor. Endokrina signalizacija rezultira trombopoezom. Preko transmembranskih receptora 130 gp odvija se signaliziranje IL-6. Prijelazom upalne faze u fazu zacjeljivanja povećava se ekspresija IL-6 i monocitnog kemoatraktant proteina 1(MCP-1). MCP 1 izaziva vazodilataciju i povećava propusnost krvnih žila, modelira funkciju fibroblasta, te utječe na sintezu kolagena. IL-6 inducira proinflamatornu proizvodnju citokina u makrofagima i monocitima putem signalnih putova MAPK i NFκB. U fibroblastima je inducirana proizvodnja faktora rasta keratinocita (KGF) (JABLONSKA- TRYPUC i sur., 2016). KGF je snažan aktivator keratinocita koji pojačava njihovu proliferaciju i migraciju (CALEY i sur., 2016). IL-6 regulira diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste putem parakrine ekspresije TGF-β na mjestu rane (AGYARE i OSAFLO, 2018.).

2.1.3. PROLIFERACIJSKA FAZA I FAZA REMODELACIJE

Proliferacijska faza nastupa smirivanjem upalne faze te smanjivanjem lučenja citokina i faktora rasta. Neutrofili se zamjenjuju makrofazima. Proliferacijska faza regulirana je faktorima rasta kao što su FGF, TGF-β, PDGF I VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*). Pod TGF-β spadaju TGF-β1-3, BMP (engl. *bone morphogenic protein*) i aktivin. TGF-

β1 luče fibroblasti, trombociti, makrofazi i keratinociti. TGF-β1 čini glavni kontrolni signal za stimulaciju fibroblasta i regulaciju njegovih funkcija. Uz to, djeluje na povećanje sinteze kolagena, elastina, proteoglikana i fibronektina. Također, smanjuje razine proteaza i stimulira tkivni inhibitor metaloproteinaza (TIMP- engl. *tissue inhibitor of metal protease*). TGF-β1 i PDGF pokreću pretvorbu fibroblasta u miofibroblaste koji će olakšati zatvaranje rane. Snažan poticaj za angiogenezu predstavlja povećana metabolička potreba i hipoksija u području rane. Zbog niske koncentracije kisika dolazi do aktivacije glavnog transkripcijskog faktora, HIF- hipoksijom- induciranog čimbenika (engl. *hypoxia-inducible factor*). HIF se sastoji od α i β podjedinice. HIF-1α regulira lučenje faktora rasta poput VEGF i TGF-β koji stimuliraju proliferaciju i migraciju stanica. U uvjetima hipoksije potiče sintezu VEGF-a. VEGF reguliraju IL-1 i TNF-α (engl. *tumor necrosis factor alfa*). VEGF pripadaju VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E te PLGF (engl. *placenta growth factor*). VEGF-A proizvode endotelne stanice, fibroblasti, trombociti, keratinociti i makrofazi. Oslobađanjem VEGF-A započinje proces angiogeneze te se potiče cijeljenje rane. Glavni stimulator angiogeneze je hipoksija odnosno nedostatak kisika. Od rubova rane formiraju se male krvne žile te međusobno stvaraju anastomoze formirajući novu kapilarnu mrežu (MARTENEZ-HERNANDEZ, 2015.).

U proliferacijskoj fazi nastaje granulacijsko tkivo. Ono se sastoji od mezenhimnih i nemezenhimnih stanica ugrađenih u mekani ECM. Uloga ECM je potpora tkivu te djeluje kao centar za staničnu diferencijaciju i popravak. Podijela je na dvije skupine proteina, a to su: fibrozni protein- kolagen i elastin te adhezivni protein- fibronektin i laminin. Kod normalnog cijeljenja rana razgradnja proteina je kontrolirana inhibitorima poput TIMP-1. Uspješno cijeljenje postignuto je u ravnoteži između stvaranja proteaza i njihovih inhibitora.

U fazi remodelacije dolazi do potpune normalizacije epitelnog sloja kože i formiranja novog tkiva. Kolagen nastao tijekom proliferacijske faze zamjenjuje se kolagenom tipa I. Organizacijom vlakana kolagena tipa I stvaraju se snopovi koji vraćaju do 80% izvorne čvrstoće tkiva. Visoka koncentracija askorbinske kiseline povećava stvaranje kovalentnih veza između vlakana. Na taj način se postiže čvrstoća snopova kolagena. Elastična vlakna vraćaju elastičnost vezivnog sloja kože i stijenka krvnih žila. Proteaze bitne u remodeliranju su metaloproteinaze, katepsin-cistein proteaze i serinske proteaze. Metaloproteinaze imaju ulogu u migraciji i invaziji stanica te reguliraju rast stanica. Također, djeluje na proces angiogeneze i remodeliranja tkiva. TIMP je inhibitor proteaza koji regulira te enzime. Blokiranje VEGF-a smanjuje angiogenezu. Na proces angiogeneze utječe katepsin-cistein proteaza koja remodelira ekstracelularni matriks.

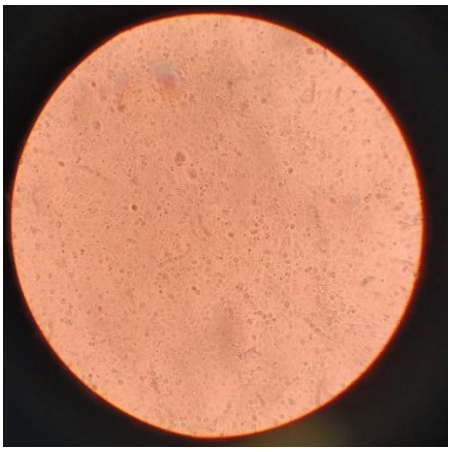
U procesu cijeljenja bitnu ulogu imaju serinske proteaze, a to su DPP IV proteaze. Dijele se na dipeptidil-peptidazu IV, molekulu CD26, protein aktivacije fibroblasta FAP (engl. *fibroblast activation protein*) te dipeptidil-peptidaza 8 i 9 (DPP8 i DPP9). DDP IV/CD26 utječe u procesu cijeljenja na proliferaciju, migraciju i preživljavanje stanica te proces angiogeneze (PUČAR i sur., 2017.). Kontraktilna aktivacija fibroblasta i miofibroblasta dovodi do pomicanja tkiva prema središtu ozljede čime se smanjuje veličina rane. Remodelacija obuhvaća sintezu i razgradnju kolagena u cilju pojačanja čvrstoće i otpornosti na istezanje. Nakon granulacije, proces remodelacije smanjuje količinu krvnih žila i broja stanica te tako smanjuje metaboličku aktivnost (HULJEV i GAJIĆ 2013.).

2.1.4. KORIŠTENJE HaCaT STANIČNE KULTURE U *IN VITRO* MODELIMA CIJELJENJA RANA

HaCaT stanična kultura je linija spontano imortaliziranih, humanih keratinocita (VAN WILLSON, 2013.). Koristi se kao *in vitro* metoda za ispitivanje brojnih farmakoloških supstanci. U tipičnim uvjetima HaCaT stanice imaju djelomično do potpuno diferenciran fenotip. HaCaT stanice pokazuju svojstva bazalnih stanica i reagiraju na različite koncentracije Ca2+ iona. Nadalje, HaCaT stanice mogu se lako inficirati adenovirusima ili transferirati za uvođenje transgena (VAN WILLSON, 2013.).



Slika 1. HaCaT stanična kultura



Slika 2. Nediferencirana HaCaT stanična kultura

2.2. MODULATORI CIJELJENJA RANA

Područje cijeljenja rana je oduvijek predmet interesa u medicini i farmaceutskoj industriji. Sredstva koja poboljšavaju cijeljenje rana kod ljudi i životinja sadrže glicerol, kompleks tripeptidnog bakrenog (TCC) hidrogela, plazmu bogatu trombocitima (PRP), spojeve cinka, aloa veru, sildenafil, tokoferol, šipak, lantanu te med i propolis (ISMAIL i sur., 2015.).

Sprejevi srebra i cinka potpomažu cijeljenje rana te imaju antimikrobni učinak. Antimikrobno utječu na gram-negativne, gram-pozitivne bakterije i rezistentne bakterije. Korištenjem srebra pomoću nanotehnologije postiže se povećanje fibroblasta u staničnoj kulturi, ali redukciju infiltracije neutrofila i makrofaga. Iako djeluje na cijeljenje rana, srebro negativno utječe na lokalnu maceraciju, staničnu citotoksičnost, hepatotoksičnost i leukopeniju (MUANGMAN i sur., 2010.). Zahvaljujući inovativnoj nanotehnologiji, izumljeni su brojni nano-lijekovi koji pomažu u regeneraciji kože. Liposomi su dvoslojni mjehurići koji pružaju zaštitu za kapsulirani lijek te njegovo sporo oslobađanje (DEGIM i sur., 2011.). Liposom s jezgrom gela utječe na stabilnost i održava stalnu proliferaciju stanica. Isto tako, potiče angiogenezu, veće bujanje i granulaciju te taloženje kolagena. Polimerne nanočestice zaštićuju lijek od proteaza prisutnih u ranama. Pokazuju antimikrobno djelovanje na *Escherichia coli* te poticanje migracije stanica keratinocita (WANG i sur., 2019.). Nadalje, poboljšana je angiogeneza i modulacija odgovora interleukina-6 i faktora rasta vaskularnog endotela (GUO i DIPIETRO, 1984.). Anorganske nanočestice su na bazi ugljika i keramike. Posjeduju antimikrobni učinak. U istraživanju cijeljenja rana opeklina pokazale su vrlo brzo zacjeljivanje

rane i smanjenje upale (WANG i sur., 2019.). Nanočestice dizajnirane s ZnO imaju dobar antibakterijski učinak prema *Pseudomonas aeruginosa* i *Aspergillus*. Tkivo je izliječeno, a rana je zacijelila. Nano- vlaknaste strukture poboljšavaju prijenos raznih terapijskih sredstava poput antimikrobnih, čimbenika za rast i nukleinskih kiselina (HU X i sur., 2014.). Molekularnom dijagnostikom RT q-PCR otkrivena je povišena ekspresija gena TGF-B1, kolagena i EGF-a. Nano vlakna povoljno utječu na angiogenezu, proizvodnju kolagena i staničnu organizaciju (HAN YH i sur., 2015.). Ključan u regeneraciji kože smatra se nanohidrogel. Nanohidrogel omogućuje očuvanje ležišta rane uz održavanje prodora kisika (ANUMOLU i sur., 2011.). Bakterijska nanokristalna celuloza odnosno hidrogel akrilne kiseline prilijepi se na fibroblaste, održava aktivnost i morfologiju fibroblasta. Uz to, utječe na ekspresiju gena povezanih s zacjeljivanjem rane poput IL-6, IL-10, GM-CSF, TGF-β i matriksa metaloproteinaza-2 (WANG i sur., 2019.).

2.2.1. TRADICIONALNE METODE I PRIPRAVCI ZA CIJELJENJE RANA

Biljni preparati poznati su od davnina u cijeljenju rana. Koriste se kao ekstrakti, emulzije, kreme i ulja, a mogu se primjenjivati izravno na koži ili sistemski te oralnim putem. Svoje djelovanje na cijeljenje rana pokazuje *Aloa vera* čiji gel te biljni sok djeluje protuupalno, antiseptično i antimikrobno. Biljka *Aloa vera* sastoji se od derivata antracena hidroksila, glukoze, oksidaze, amilaze te vitamina B1, B2, B6, C i E (BOUDREAU i BELAND, 2006.). Primjenom *Aloa vera* gela na opekotinama dokazano je brže zaraštanje nego kod kontrolne skupine u kojoj nije primijenjena (PEREIRA i BARTOLO, 2016.). Oralnom primjenom *Aloa vere* u štakora s dijabetesom tipa 2, ubrzalo se zacjeljivanje rana na koži. Isto tako, liječenje *Aloa verom* ubrzalo je porast brzine ekspresije u genu vaskularnog endotela faktora rasta VEGF i TGF-1 u području rane (HASHEMI i sur., 2015.). U ovom slučaju, TGF-1 stimulirao je fibroblaste za bolju rekonstrukciju izvanstaničnog matriksa na mjestu rane. Primjenom *Calendula officinalis* u *in vitro* metodi na miševima s opeklinama postiže se protuupalni učinak te utječe na antioksidativnu aktivnost. Topikalna aplikacija *Calendula officinalis* potiče cijeljenje akutne rane u miševa s opeklinama. Smanjuje vrijeme epitelizacije i povećava kontrakcije rane, razinu kolagena i formaciju krvnih žila (NAYAK i PEREIRA, 2006.). Razina proizvodnje kolagena je 7% veća u usporedbi s kontrolom i placebo grupom (PEREIRA i BARTOLO, 2016.). U kliničkoj praksi koristi se za cijeljenje rana ulkusa te akutnog

dermatitisa. Dokazano je 43% veće smanjenje rane ulkusa u usporedbi s kontrolnom skupinom (PEREIRA i BARTOLO, 2016.).

2.3. PROPOLIS

Crveni propolis sadržava visok udio flavonoida. Propolis topola tipa bogat je flavonoidima, fenilpropanoidima, terpenoidima, terpenoidima, kumarinima i njihovim derivatima. Derivati kvercetina i kampferola se također nalaze u propolisu topole, ali topola propolis sadrži najnižu razinu fenolne kiseline (GROOT, 2013.). Mediteranski propolis bogat je dihidrocinamičnim kiselinama, ali isto ima manji sadržaj flavonoida od europskog. Unatoč tome pokazuje antimikrobni utjecaj na *Staphylococcus aureus*. Zbog visokih koncentracija terpenil estera inhibira rast *Candida albicans* (POPOVA i sur., 2007.). Kafeinska kiselina ima snažno protuupalno djelovanje - inhibira proizvodnju dušikovog oksida u makrofazima bez izazivanja citotoksičnih učinaka na stanicama (PEREIRA I BARTOLO, 2013.). Terpenoidi predstavljaju 10% sastojka propolisa, a pokazuju antimikrobni i antioksidativni učinak. Uz to, sadržava veliku količinu fenetil estera kofeinske kiseline, izopentil ferulat i moronsku kiselinu. Fenetil ester kofeinske kiseline (CAPE) ima imunosupresivno djelovanje za aktivnost T stanica koje imaju ključnu ulogu u nastanku upalnih bolesti. Inhibira transkripciju RNA za interleukin-2. Isto tako, inhibira rast bakterija sprječavajući staničnu podjelu, uključujući djelomičnu bakteriolizu i inhibiciju sinteze proteina (INUI i sur., 2014.). 3-metil-but-2-enil kofeat, izopentil ferulat i moron kiselina imaju značajno antivirusno djelovanje. Kafeoilkinske i prenilirane cimetne kiseline poput artepilina C i baharina odgovorni su za antioksidativno djelovanje i inhibitornu aktivnost protiv nekih enzima (BERRETTA i sur., 2012.). Propolis također sadrži druge komponente poput vitamina, proteina, aminokiselina, B steroida, šećera i alkohola (KUREK-GORECKA, 2013.). Aromatični spojevi su odgovorni za antibakterijska, antimikotična, antivirusna, protuupalna i protutumorska svojstva propolisa (ORHAN i sur., 1999.). Uz to, propolis djeluje na grinje poput prirodnog pesticida. Lipofilni akaricid postiže štetno djelovanje prema grinjama (TORETI, 2013.).

Propolis djeluje imunomodulatorno, antimikrobno, antioksidativno, analgetsko i protuupalno čime potiče brže cijeljenje rana.

2.3.1. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE PROPOLISA

Propolis posjeduje antibakterijski učinak te sprečava umnažanje bakterija i potiče njihovu smrt. Isto tako, sprječavanja stvaranje biofilma (WOJTYCKA i sur., 2013.). Uz to djeluje antimikotično prema gljivičnim kulturama i antivirusno. U *in vitro* metodama ispitivanja propolis izravno utječe na mikroogranizme, dok kod *in vivo* pokusa stimulira imunološki sustav na aktivaciju mehanizmama obrane od mikroorganizama (SFORICIN i sur., 2000.). Na antimikrobni učinak propolisa utječu mnogi čimbenici poput izvora uzorka, doze i načina ekstrakcije i primjenjenog otapala. Iranski i brazilski propolis antimikrobno djeluju na gram-pozitivne bakterije, spore gljivica i viruse, ali pokazuju ograničeno djelovanje prema gram-negativnim bakterijama (MIGUEL i sur., 2010.). S obzirom na isto, u sinergijskom djelovanju antibiotika i propolisa primjećena je veća antimikrobna učinkovitost prema većem broju bakterija. Protiv *Salmonella typhi* djeluje brazilski i bugarski propolis (ORSI i sur., 2005.). Antibiotici djeluju na inhibiciju sinteze proteina dok istraživanja pokazuju da je jedan od mehanizama djelovanja propolisa inhibicija RNA polimeraze (PILLAI i sur., 2010.). Ipak, antibiotici koji djeluju na DNA teško stupaju u interakciju s propolisom. Najzastupljeniji spojevi u propolisu su flavonoidi koji utječu na antimikrobni učinak propolisa. U bakterijskim kulturama stanica reguliraju različite unutarstanične signalne kaskade preko aktivacije proteinskih kinaza poput mitogen-aktivirane protein kinaze. Flavonoidi djeluju na način da denaturiraju bjelančevine u stanici, inhibiraju bakterijske RNA glukotransferaze te inhibiraju enzime svojim oksidacijskim osobinama. Kvercetin se veže na podjedinicu DNA-giraze *Escherichia coli* te inhibira aktivnost ATP-a (MASSARO i sur., 2015.). Također inhibiraju topoizomerazu IV i rast bakterije *Escherichia coli*. Pod djelovanjem flavonoida dolazi do povećanja propusnosti unutarnje bakterijske membrane. Membranski potencijal se raspršuje i smanjenje otpornost bakterijskih stanica.

Artepilin C je fenolni spoj koji ima bakteriostatski i protuupalni učinak. Protuupalni učinak posredovan je modulacijom NF-κB i inhibicijom prostaglandina E i dušikovog oksida. Cimetna kiselina oštećuje membranu stanice inhibirajući ATP, diobu stanice i stvaranje biofilma. Aktivacijom MAPK-a, inducirat će se fosforilacija inhibitornih proteina kao što je κB (PILLAI i sur., 2010). Antimikrobni učinak propolisa predstavlja jednu od glavnih uloga u cijeljenju rana upravo zbog sprječavanja širenja daljnjih bakterijskih infekcija.

2.3.2. ANTIOKSIDATIVNI UČINAK PROPOLISA

Propolis se koristi kao antioksidans prilikom čega smanjuje količinu reaktivnih dušikovih spojeva i slobodnih radikala (OLCZYK i sur., 2013). Antioksidativno djelovanje propolisa potiče visoka koncentracija polifenola i flavonoida. Polifenolni spojevi imaju važan učinak u zaštiti eritrocita od oksidativnog stresa (BANSKOTA i sur., 2011.). Polifenoli se vežu na reaktivne kisikove spojeve poput superoksida, hidroksilnih radikala i vodikovog peroksida. Afinitet vezanja polifenola dovodi do stvaranja kelata metala s povećanom antioksidativnom aktivnošću. Kaemferol se veže za cink, kofaktor za više od 300 metaloenzima bitnih za rast i razvoj. Time čine kompleks sakupljača radikala. Provode zaštitu na način da uklone radikale peroksida u vodenoj fazi i spriječe peroksidaciju te hemolizu (GAVANJI i sur., 2015.). Polifenoli inhibiraju enzime koji stvaraju slobodne radikale, poput NADPH i ksantin oksidaze ili povećaju ekspresiju antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze i katalaze (FARINES i sur., 2004.). Upravo se to događa disocijacijom između Kelch- sličnog proteina povezanog s ECH i faktorom 2 povezanim s nuklearnim faktorom E2. Regulacijom protein kinaze C dodatno utječe na antioksidativni učinak. Kod visokih koncentracija ROS-a i RNS-a, polifenoli i CAPE povećaju ekspresiju gena AMP-a i olakšavaju ponovnu epitelizaciju veza u koži (NIYONSABA i sur., 2007.).

2.3.3. UTJECAJ PROPOLISA NA MASTOCITE TIJEKOM CIJELJENJA RANA

Mastociti se nakupljaju na rubovima rane usljed ozljede tkiva gdje oslobađaju vazoaktivne porednike poput histamina, proteaza, tumorskog nekroza faktora (TNF) i metabolita arahidonske kiseline (RUSSO i sur., 2002.). Metaboliti arahidonske kiseline dovode do vazodilatacije i povećavaju vaskularnu propusnost. Isto tako, mastociti potiču stvaranje heparina, triptaze i t-aktivatora plazminogena (ALBUQUERQUE-JUNIOR i sur., 2009.), doprinose otapanju ugrušaka te potiču antikoagulacijsku aktivnost (RUSSO i sur., 2002.). VEGF s TGF-β1 potiče angiogenezu i proliferaciju. Nakon faze intenzivne proliferacije, mastociti potiču proizvodnju kolagena i kontrakciju α-glatkog mišićnog aktina (NG, 2010.). Radovi su pokazali da lokalnom primjenom propolisa se smanjuje broj mastocita te ubrzava proces cijeljenja rane (NG, 2010.). U akutnoj upalnoj fazi, fenetil ester kafeinske kiseline smanjuje stimulaciju pretvorbe fibroblasta u fenotip miofibroblasta.

2.3.4. PROTUUPALNI UČINAK PROPOLISA

Propolis djeluje protuupalno na akutnu i kroničnu fazu upale. Dokazano je da prisutnost propolisa u biofilmu na bazi kolagena ubrzava zacjeljivanje rana, modulirajući dinamiku upalne evolucije i postupka taloženja kolagena (MINOR, 1989.). Protuupalni učinak propolisa posljedica je djelovanje njegovih sastavnih dijelova: kafeinske kiseline, kvercetina, naringenina, fenetil estera kafeinske kiseline, salicilne kiseline, apigenina, ferulinske kiseline, vestitola, neovestitola i galangina. Protuupalni učinak propolisa temelji se na potiskivanju sinteze prostaglandina i leukotriena te aktivnost mijeloperoksidaza, NADPH-oksidaze i tirozin-protein kinaze (CHO i sur., 2014). CAPE je najznačajnija biološki aktivna komponenta u propolisu koja ima važnu ulogu u smanjenju upalnih procesa. Isto tako, smanjuje razine aldehida u plazmi što je pokazatelj stvaranja slobodnog radikala u završnoj fazi peroksidacije lipida (NG, 2010.). Molekularnim mehanizmom smanjivanja slobodnih radikala utječe na brže zaraštanje rane. Inhibicija aktivacije NF-κB molekularna je osnova za protuupalno djelovanje propolisa. Kvercetin i langin sprječavaju aktivnost ciklooksigenaze i lipooksigenaze te smanjuju ekspresiju COX-2 (ORYAN i sur., 2018.). Propolis potiskuje fosforilaciju inhibitora proteina za vezanje κB i proteina aktivatora 1. Ipak, ne utječe na njihovu razgradnju, ali blokira NF-*κ*B. Galangin je spoj identificiran u propolisu topole koji također ima odgovarajuće protuupalno djelovanje (PARK i sur., 2002.). Pokazalo se da galangin inhibira fosforilaciju NF-κB. Formononetin je pokazao inhibitorno djelovanje na migraciju neutrofila i antidematogeni učinak u testu edema šape. Histopatološkom metodom dijagnostike, dokazano je da propolis skraćuje upalnu fazu zacjeljivanja rana. Propolis ubrzava aktivnost i smanjenje broja upalnih stanica i fibro-vaskularnog područja. Povećanjem količine kolagena, ubrzava se zatvaranje rane (ORYAN i sur., 2018.).

2.3.5. *IN VITRO* ISPITIVANJA UČINAKA PROPOLISA NA PROCESE CIJELJENJA RANA

Na HaCaT staničnoj kulturi ispitivano je djelovanje propolisa metodama Kalcein- AM testa te *Scratch* test. Kalcein-AM test cijepa unutarstanične esteraze stvarajući hidrofilnu fluorescentnu boju. Test je pokazao nisku citotoksičnost. Korištenjem *Scratch* testa ispitivana je migracija stanica. Rezultati pokazaju da etanolni ekstrakt propolisa izazva izrazito povećanje sposobnosti obnavljanja rana keratinocita u usporedbi sa stimulacijom izazvanom trombocitnim lizatom. Propolis inducira zatvaranje rane HaCaT stanica u različitoj mjeri. 0.01% propolis

izazvao je učinak slično onom kao s PL trombocitnim lizatom dok je na 0.001% uspio potaknuti zatvaranje rane veće od onog s PL. Metodom inhibicije glavnih staničnih signalnih puteva BAPTA-AM dokazani su osnovni mehanizmi iskorištavanja propolisa. BAPTA-AM najučinkovitiji je inhibitor testa zatvaranja rane koji potvrđuje bitnu ulogu unutarstaničkog kalcija. Fenolni spojevi poput galagina, krizina i pinocembrina privremeni su nositelj elektron redoks reakcijskih serija koji se prenose na molekule kisika stvarajući superoksid, nakon čega nastaje H2O2. Migracijom stanica dokazano je da propolis stimulira keratinocite da zatvore ranu. Glavni posrednik regenerativnih svojstava propolisa jest H2O2 (MARTINOTTI i sur., 2019.). Izvanstanično oslobođen H_2O_2 mogao je proći kroz membranu plazme preko akvaporina AQP3 i modulirati unutarstanični odgovor. AQP3 ima ključnu ulogu u transportu glicerola koji sudjeljuje u hidrataciji i elastičnosti kože, ali i proliferaciji stanica. Upotrebom N- nanočestice RNA transfekcijskog sustava procjenjena je uloga AQP3 na način da je spriječen rad iste. Provedenom analizom rane nije uočena znatnija varijacija u stopi zatvaranja rane čime je potvrđena ključna uloga AQP3 u posredovanju zatvaranja rane izazvanog propolisom. U staničnim kulturama propolis može inducirati proizvodnju H_2O_2. Korištenjem testa ksinol *orange* procijenjena je proizvodnja H_2O_2 inducirana propolisom, a iznosila je 0.5 H_2O_2 ng/mL. Prepostavljeno jest da nakon što se pusti u izvanstanični prostor, H_2O_2 se raspodjeljuje po cijeloj površini plazma membrana koje su odgovorne za povećanje unutarstanične koncentracije ROS-a (BOURY-JAMOT i sur., 2009.). Mjerenjem fluorescencije na HaCaT staničnoj kulturi izmjereno je povećanje unutarstanične koncentracije ROS-a te također u keratinocitima nakon djelovanja propolisa (BOURY-JAMOT i sur., 2009.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. IZRADA OTOPINA EKSTRAKTA PROPOLISA

Propolis je usitnjen standardnom metodom ekstrakcije, maceracijom pri sobnoj temperaturi tijekom 24 h s otapalom PEG 400 uz dodatak lecitina prema postupku koji je zaštićen patentom (RADIĆ i sur., 2020.). Nakon maceracije, neotopljeni ostatak je odvojen filtracijom, a bistri filtrat korišten kao modelni tekući ekstrakt propolisa za daljnje ispitivanje. Metodom vaganja procijenjeno je da je u ekstraktu otopljeno 30.33% propolisa. Ekstrakt je standardiziran prema metodi navedenoj u patentu br. WO/2020/169425 (RADIĆ i sur., 2020.), mjerenjem koncentracije četiri markera: kavene, ferulične i kumarinske kiseline, te CAPE, metodom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (PELLATI i sur., 2013.; RADIĆ i ŠURAN, 2020.).

3.2. ANALIZA MARKERA U EKSTRAKTU PROPOLISA

Koncentracije odabranih markera ekstrakta propolisa su se izmjerile metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Vis detektorom (Shimadzu, Kyoto, Japan). 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 se 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. BAKTERIOLOŠKI POSTUPCI

3.3.1. Izdvajanje bakterija i gljivica- McFarland denzitometar

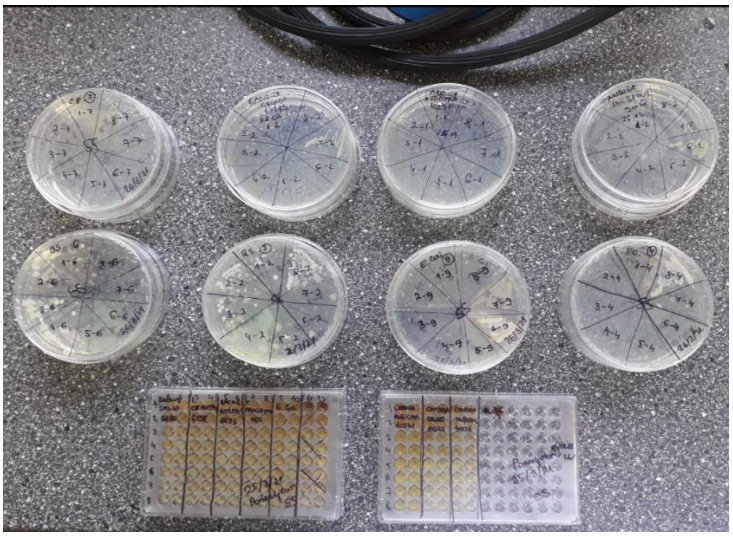
U ispitivanju antimikrobne učinkovitosti testirane su bakterije *Bacillus subtilis* (ATCC 6603, ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 8739, ATCC 10538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027, ATCC 27853), *Enterococcus* (ATCC 2912), *Enterococcus hirae* (ATCC 8043), i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Isto tako, korištene su gljivice: *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 90028), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida crusei* (ATCC 14243), *Issatchenkia orientalis* (ATCC 6358), *Candida tropicalis* (ATCC 750) i *Candida kefyr* (ATCC 2572). Bakterije i gljivice izdvojene su iz petrijevih zdjelica sa LBM agra. Optička gustoća suspenzije podešena je denzitometrijski na 0.5 MacFarlandovih jedinica. Rađen je serijski mikrodilucijski postupak kako bi se odredile minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) EUCAST metodom.

3.3.2. Priprema nasađivanja

Ekstrakt propolisa serijski se razjeđivao u 100 µL Muller Hinton bujona za bakterije i RPMI bujon za gljivice. U prvi red na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica dodalo se 100 µL otopine propolisa. U sve jažice dodano je 100 µL Muller Hinton bujona za bakterije ili RPMI bujon za gljivice. Provedeno je serijsko razjeđenje na mikrotitracijskim pločicama u rasponu od 100 do 0.7125 µg/ml. Nakon inokulacije bakterijskih i gljivičnih kultura koje su podešene 10^{7}CFU/ml, bakterijske pločice su inkubirane 24h na 37°C, dok su gljivice inkubirane 48h.

3.3.3. Priprema LB agra

Za LB Medium bujon, potrebno je odvagati 20 g LB Medium agra te staviti u 1 litru mQ vode. U istu čašu stavljamo magnet te kada se otopi izlijevamo 100 ml u Erlenmayerove tikvice. Prije autoklaviranja u tekući bujon potrebno je dodati 1.25 g agra za 100 ml bujona za pripremu LB agar ploča.



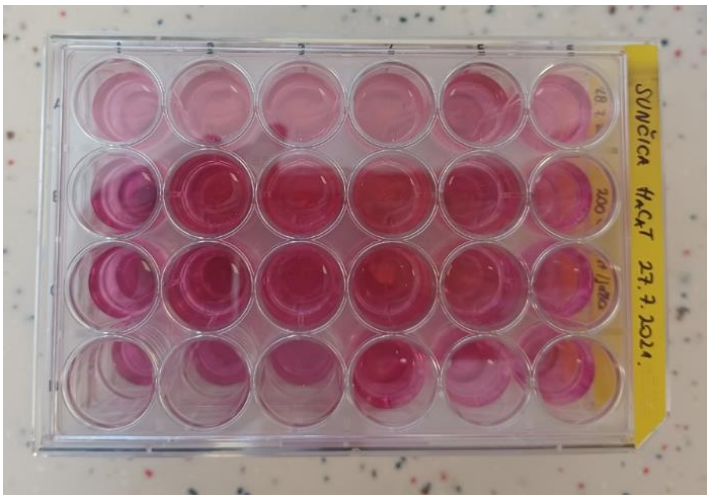
Slika 3. Očitavanje rezultata nakon nasađivanja bakterijskih i gljivičnih kultura

3.4. RAD SA STANIČNOM KULTUROM HaCaT

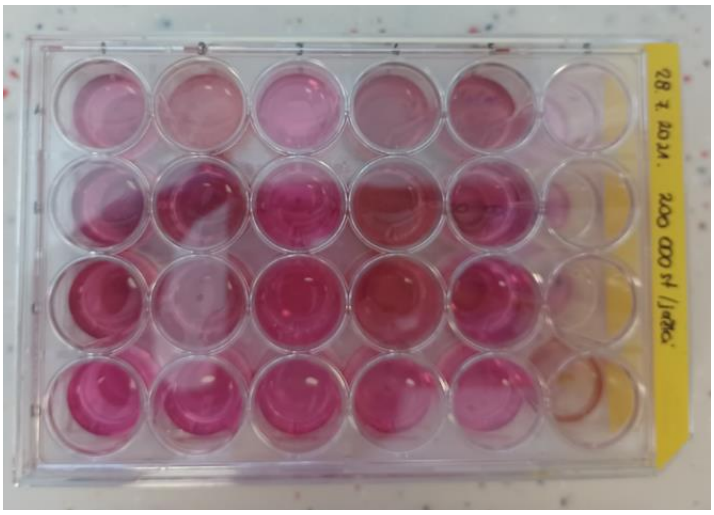
Stanicama nakon odmrzavanja potrebno je 3 - 4 dana da postignu konfluentnost. Nakon što su stanice prekrile površinu, potrebno ih je rasaditi (razrjeđenje četiri puta). Bazalni keratinociti su vretenasti i labavo zbijeni, dok su diferencirane stanice kvadratičnog oblika s većim stadijem rasta.

Brojanje stanica vrši se na brojaču Beckamn Counter Size Analyser.

Na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasađeno je 20 000 stanica, dok je na mikrotitarsku pločicu s 24 jažice nasađeno 70 000 i 200 000 stanica po jažici. Nakon toga su inkubirane 24 sata te tada tretirane ekstraktima propolisa.



Slika 4. Mikrotitarska pločica s 24 jažice i 70 000 stanica po jažici



Slika 5. Mikrotitarska pločica s 24 jažice i 200 000 stanica po jažici

Unaprijed su pripremljene otopine ekstrakta propolisa (10%, 5%, 2.5%) za određivanje citotoksičnosti primjenom MTT testa. Nasađene stanice su tretirane u triplikatu kao što je prikalazno u Tablici 2.

Tablica 1. Mikrotitarska pločica s 96 jažica tretirana koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa

10%	10%	10%	Kontrola A	10%	10%	10%	Kontrola A
5%	5%	5%	Kontrola B	5%	5%	5%	Kontrola B
2.5%	2.5%	2.5%	Kontrola C	2.5%	2.5%	2.5%	Kontrola C
Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno	Kontrola prazno

Koncentrirane otopine 10%, 5%, 2.5%:

1. 1000 µL 30% otopine = 10%
2. 500 µL 10% + 500 µL medija = 5%
3. 300 µL 5% +300 µL medija= 2.5%

U jažice je u triplikatu dodano:
1. 20 µL 10% otopine + 200 µL medija
2. 20 µL 5% otopine + 200 µL medija
3. 20 µL 2.5% otopine + 200 µL medija

Kontrolne skupine su:
1. Kontrola A 400 µL etanola + 2600 µL medija
2. Kontrola B 200 µL otopine A + 200 µL medija
3. Kontrola C 200 µL otopine B + 200 µL medija
(od navedene otopine 100 uL je dodano u svaku jažicu kako bi se postigla koncentracije etanola koja se nalazi u zadanoj otopini propolisa).

3.5. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI I VARIJABILNOSTI

MTT test je kolorimetrijski test za procjenu metaboličke aktivnosti stanica. Koristi se za mjerenje citotoksičnosti odnosno gubitka vitalnih stanica. Uz to, mjeri citostatičku aktivnost tj. prelazak s proliferacije u stanje mirovanja potencijalih lijekova i otrovnih materijala. NAD (P) H-ovisni stanični oksidoreduktazni enzimi mogu odražavati broj prisutnih održivih stanica. Ovi enzimi su sposobni reducirati tetrazolijevu boju MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolijev bromid do njegovog netopivog formazana, koji ima ljubičastu boju. Metabolički aktivne stanice reduciraju MTT sol u formazan koji se u stanicama nakuplja u obliku ljubičastih kristala. Tijekom inkubacije dolazi do promjene boje u ljubičastu. MTT test potrebno je raditi u mraku i digestoru jer je MTT reagens osjetljiv na svjetlost. Nakon 4h inkubacije, stavlja se DMSO. Intenzitet obojenja otopine očitava se spektrofotometrijski na valnoj duljini 570 nm pomoću mikročitača µQuant (Biotec Inc.). Intenzitet obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica u uzorku.

3.6. *SCRATCH* TEST

Scratch test je rađen nakon potpune prekrivenosti jažica sa stanicama. U svakoj jažici vrhom pipete je napravljena rana. *Scratch* test koristi se za mjerenje osnovnih parametara migracije stanica poput brzine i prekrivenosti. Stanice se polariziraju na rubu rane i migriraju u prostor rane. Time se mjeri vrijeme potrebno za cijeljenje rane. Stanice su slikane na početku te za vrijeme cijeljenja 1, 2, 3 dan.

Tablica 2. Tretiranje koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa (200 000 st./jažica)

10%	10%	Kontrola A	Kontrola A
5%	5%	Kontrola B	Kontrola B
2.5%	2.5%	Kontrola C	Kontrola C
Kontrola	Kontrola	Kontrola prazna	

Koncentrirane otopine:
1. 20 µL 10% otopine + 200 µL medija
2. 20 µL 5% otopine + 200 µL medija
3. 20 µL 2.5% otopine + 200 µL medija

Uz to, pripremljene su kontrole koje su dodane u količini 20 µL
1. Kontrola A 400 µL etanola + 2600 µL medija
2. Kontrola B 200 µL otopine A + 200 µL medija
3. Kontrola C 200 µL otopine B + 200 µL medija

Tablica 3. Tretiranje stanica koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa (70 000 st./jažica)

KONTROLA	KONTROLA	1.5%	1.5%	1%	1%	0.5%	0.5%
KONTROLA	KONTROLA	1.5%	1.5%	1%	1%	0.5%	0.5%
KONTROLA	KONTROLA	1.5%	1.5%	1%	1%	0.5%	0.5%
KONTROLA	KONTROLA	PRAZNA	PRAZNA	PRAZNA	1%	PRAZNA	PRAZNA

1. 150 µL otopine 3% + 150 µL medija = 1.5%
2. 150 µL otopine 1.5% + 100 µL medija=1 %
3. 1% / 2 = 0.5%

3.7. ODREĐIVANJE INTERLEUKINA-6

Interleukin-6 smo odredili pomoću Interleukin-6 (human) Elisa Kit-a (Cayman). Testni medij (pufer) pripremljen je nakon što se u koncentrat pufera B dodalo 90 ml deionizirajuće vode. 5 ml pufera za ispiranje razrjedilo se u volumenu 2 litre ultračiste vode i dodano je 1 ml polisorbata 20. Reagensi su pripremljeni na način da je liofilizirani IL-6 Elisa standard dodan u 2 ml testnog pufera. Standardi su pripremljeni označivanjem 8 tubica. U prvu je dodano 475 µL testnog pufera, dok od druge do osme epice 250 µL pufera. 25 µL matičnog standarda dodalo se u prvu tubicu. Rađena su serijska razrjeđenja od 250 µL do sedme tubice, u 8. tubici nije dodano. Anti IL-6 Biotinski konjugat pripremljen je u 12 mL testnog pufera. Radna otopina priprema se dodavajući 1.2 mL Streptavidin-HRP u 10.8 ml testnog pufera. Potrebno je provoditi to u mraku s obzirom na osjetljivost Streptavidina- HRP na svjetlost. U mikrotitarskoj pločici s 96 jažica dodano je 100 µL standarda i dilutiranog uzorka u duplikatu, kao što je prikazano na Tablici 5. Sve je pokriveno plastičnom folijom i inkubirano 1h na sobnoj temperaturi na vorteksu. Jažice su ispražnjene i oprane pet puta s puferom za ispiranje. Potrebno je okrenuti i u potpunosti isprazniti. 100 µL rekonstruiranog Anti IL-6 Biotinskog konjugata dodano je u jažice. Pokriveno je plastičnom folijom i inkubirano 1h na shakeru. Nakon što se jažice isprazne, isperu se pet puta s puferom za ispiranje. 100 µL radne otopine Streptavidina-HRP dodaje se u sve jažice. Zatim se ponovno pokriju jažice i inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi na shakeru. Jažice se isprazne i isperu pet puta s puferom za ispiranje. Dodaje se 100 µL TMB supstrat otopine svakoj jažici. Nakon 10-15 min inkubacije pri sobnoj temperaturi u mraku, razvija se plava boja. Nakon pojave plave boje potrebno je izmjeriti standarde spektrofotometrijski na valnoj duljini 650 nm. Kada maksimum standarda dosegne 0.5-0.6 potrebno je dodati 100 µL Stop otopine u sve jažice. Plava boja se pretvara u žutu boju. Rezultati se očitavaju spektrofotometrijski na valnoj duljini 450 nm.

Tablica 4. Mjerenje IL-6 na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica

		70 000 3. DAN	70 000-3.DAN		70 000-1. DAN	70 000-1. DAN	70 000-2. DAN			
ST 1	ST 1	1.5%	1%	70 000 K-A-3	1.5%	1%	1.5%	200 000 1.5%	200 000 K-A	70 000 K- A-1
ST 2	ST 2	1.5%	1%	70 000 K-B-3	1.5%	1%	1.5%	200 000 1.5%	200 000 K-B	70 000 K-B-1
ST 3	ST 3	1.5%	1%	70 000 K-C-3	1.5%	1%	1.5%	70 000 K- A-2	200 000 K-C	70 000 K-C-1
ST 4	ST 4	1.5%	0.5%	200 000 10 %	1.5%	1%	1.5%	70 000 K- A-2	200 000 10 %	200 000 1.5%
ST 5	ST 5	1.5%	0.5%	200 000 5%	1.5%	0.5%	1%	70 000 K- A-2	200 000 5%	200 000 1.5%
ST 6	ST 6	1.5%	0.5%	200 000 2.5%	1.5%	0.5%	1%	70 000 K- A-2	200 000 2.5%	200 000 1%
ST 7	ST 7	1.5%	0.5%	200 000 10 %	1.5%	0.5%	1%	200 000 1%	200 000 10 %	200 000 1%
ST 8	ST 8	1.5%	0.5%	200 000 5%	1.5%	0.5%	1%	200 000 1 %	200 000 5%	200 000 1 %

3.8. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati su obrađeni statistički korištenjem računalnog programa Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 8 i Cell Profiller. Rezultati su prikazani su grafički i tabelarno, uz korištenje statističkih programa t testa i ANOVA testa.

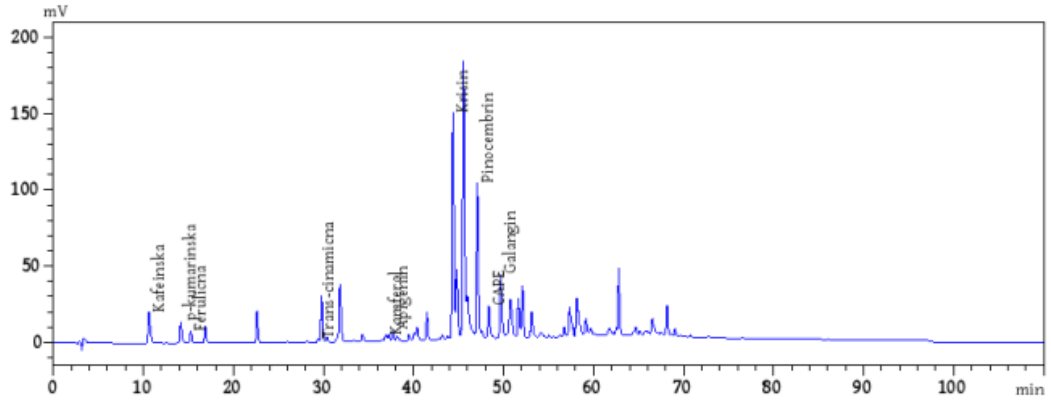
4. REZULTATI

4.1. KONCENTRACIJE MARKERA U EKSTRAKTU PROPOLISA

Koncentracije 4 markera ekstrakta propolisa važnih za standardizaciju su prikazane u Tablici 5. Kromatogram ekstrakta propolisa prikazan je na slici 6.

Tablica 5. Koncentracije markera koji se koriste u standardizaciji ekstrakta propolisa

Marker	**Koncentracija (µg/g)**
Kafeinska kiselina	2919.08
p-kumarinska kiselina	788.99
Ferulična	614.87
CAPE	5640.13



Slika 6. HPLC-UV kromatogram ekstrakta propolisa s markerima biološke aktivnosti

4.2. MINIMALNA INHIBICIJSKA KONCENTRACIJA BEZALKOHOLNOG EKSTRAKTA PROPOLISA

Minimalna inhibicijska koncentracija je najniža koncentracija antimikrobnog lijeka koja inhibira proliferaciju, odnosno rast mikroorganizma nakon inkubacije. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) ekstrakta propolisa prema bakterijskim kulturama prikazana je u Tablici 6.

Tablica 6. MIK ekstrakta propolisa na bakterijskim kulturama

Bakterijske kulture:	MIK mg/ml
Bacillus subtilis ATCC 6603	1,87
Bacillus subtilis ATCC 6630	1,87
Bacillus cereus ATCC 11778	7,5
Enterococcus fecalis ATCC 9212	3,75
Enterococcus hirae ATCC 8043	1,87
Staphylococcus aureus ATCC 25923	1,87
Escherichia coli ATCC 8739	0,468
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,468
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0,93

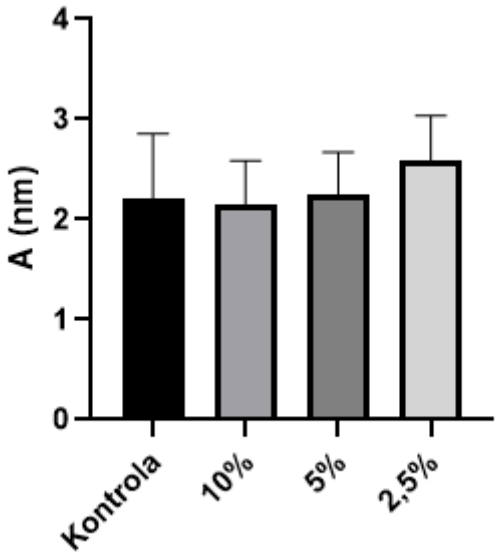
Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) ekstrakta propolisa prema gljivičnim kulturama prikazana je u Tablici 7.

Tablica 7. MIK ekstrakta propolisa na gljivičnim kulturama

Gljivične kulture:	MIK mg/ml
Candida albicans ATCC 10231	0,93
Candida albicans ATCC 90028	0,93
Candida parapsilosis ATCC 22019	0,23
Candida crusei ATCC 14243	0,468
Issatchenkia orientalis ATCC 6358	0,23
Candida tropicalis ATCC 750	0,23
Candida kefyr ATCC 2572	0,468

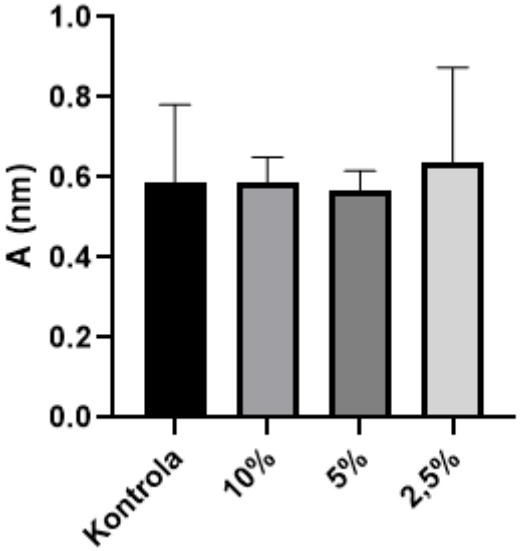
4.3. MTT TEST CITOTOKSIČNOSTI I VARIJABILNOSTI STANICA

Citotoksičan učinak ekstrakta propolisa praćen je na HaCaT staničnoj kulturi. Prikazani rezultati su srednje vrijednosti dobivenih triplikata rezultata. Rezultati na slici 7. prikazuju postotak preživljenja tretiranih stanica s 10%, 5% i 2.5% otopinom propolisa u usporedbi s kontrolama A, B i C.



Slika 7. Citotoksičnost ekstrakta propolisa na HaCaT staničnoj kulturi

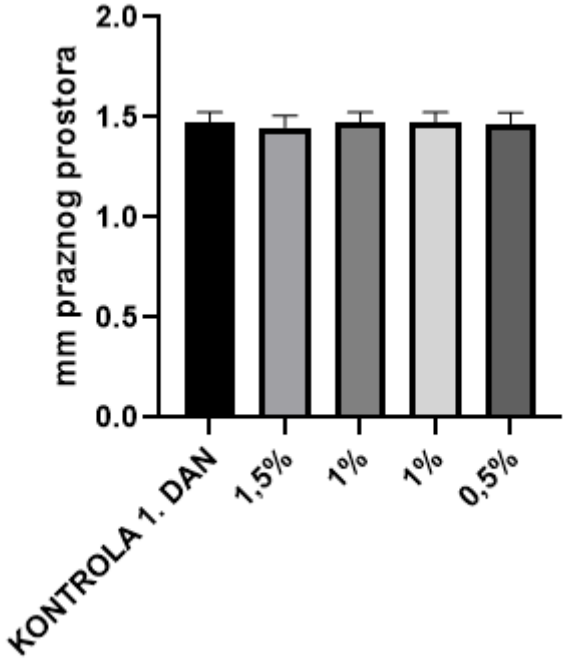
S obzirom na veliku zasićenost jažica zbog specifičnih pigmenata propolisa, bilo je potrebno u sljedećem mjerenju odvojiti 50 µL sadržaja jažica. Odvojene koncentracije otopina propolisa i koncentracija mjerene su MTT testom. Rezultati na slici 8. prikazuju usporedbu tretiranih jažica s propolisom te kontrolama A, B i C. Rezultati oba mjerenja uključujući kontrole, ukazuju da koncentracije 10%, 5% i 2,5% nisu toksične za stanice te nisu izazvale uginuće istih.



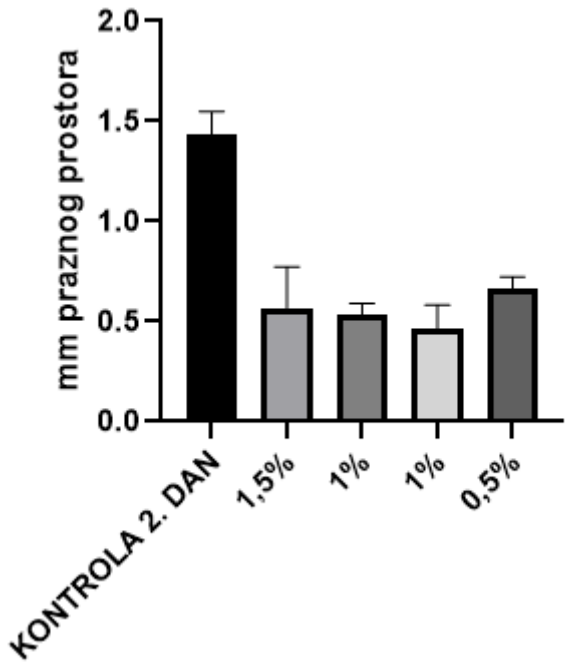
Slika 8. Citotoksičnost ekstrakta propolisa na HaCaT staničnoj kulturi

4.4. *SCRATCH* TEST

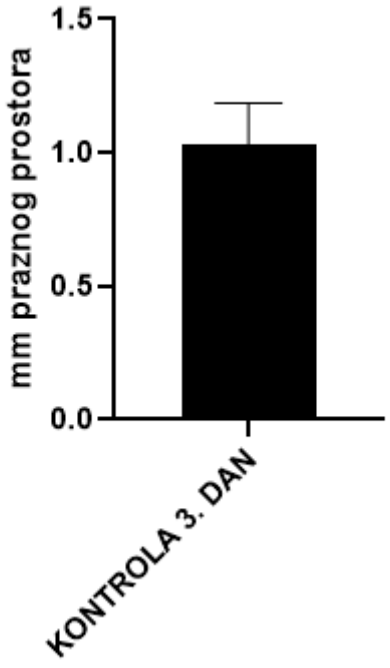
Scratch testom mjerena je migracija stanica ovisna o vremenskom periodu. Tijekom prvog dana tretiranja stanica s koncentriranim otopinama i kontrolama, učinjen je *scratch* test odnosno rana. Širina prostora s kojeg su uklonjene stanice je mjerena prvi, drugi dan te treći dan kada je došlo do potpunog prerastanja praznog prostora stanicama.



Slika 9. Usporedba stanicama tretiranih kontrolama i koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa, prvog dana *scratch* testa



Slika 10. Usporedba stanica tretiranih kontrolama i koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa, drugog dana *scratch* testa



Slika 11. Rezultati stanica tretiranih kontrolama, trećeg dana *scratch* testa

Prvi dan *scratch* testa razmak između rubova rane iznosi 1.4-1.5 mm u svim jažicama. Isto vidimo na slici 9. Drugi dana *scratch* testa primijećena je brža migracija stanica u jažicama tretiranim s bezalkoholnim ekstraktom propolisa. Najveća vrijednost cijeljenja rane zabilježena je u 1.5% i 1% otopini ekstrakta propolisa. Isto možemo primjetiti na slici 10. U usporedbi 1.5% ekstrakta propolisa 1. i 2. dan vidimo izrazito smanjenje područja rane odnosno veće zaraštanje. Srednje vrijednosti rezultata 1.5% ekstrakta propolisa prvog dana u usporedbi s drugim danom istih tretiranih koncentracija zaključuju porast u rastu od 0.9 mm. Slike 14., 15. i 16. prikazuju stanice tretirane s 1.5% otopinom bezalkoholnog ekstrakta propolisa. Najveća vrijednost cijeljenja rana između jažica prvog dana u usporedbi s drugim iznosi 1 mm. 1% otopina ekstrakta propolisa ispitana je u dvaput. Slike 17.-23. prikazuju stanice tretirane s 1% otopinom bezalkoholnog ekstrakta propolisa. Srednje vrijednosti između prvog dana cijeljenja te drugog dana iznosi 1mm. Slike 24.-26. prikazuju jažice tretirane s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa. Cijeljenje rana iznosi 0.8 mm. Kontrole A, B i C signifikantno manje potiču cijeljenje rane kroz 3 dana mjerenja, što je vidljivo na slikama 12. i 13.

Tablica 8. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 1. dan *scratch* testa (nakon tretiranja jažica)

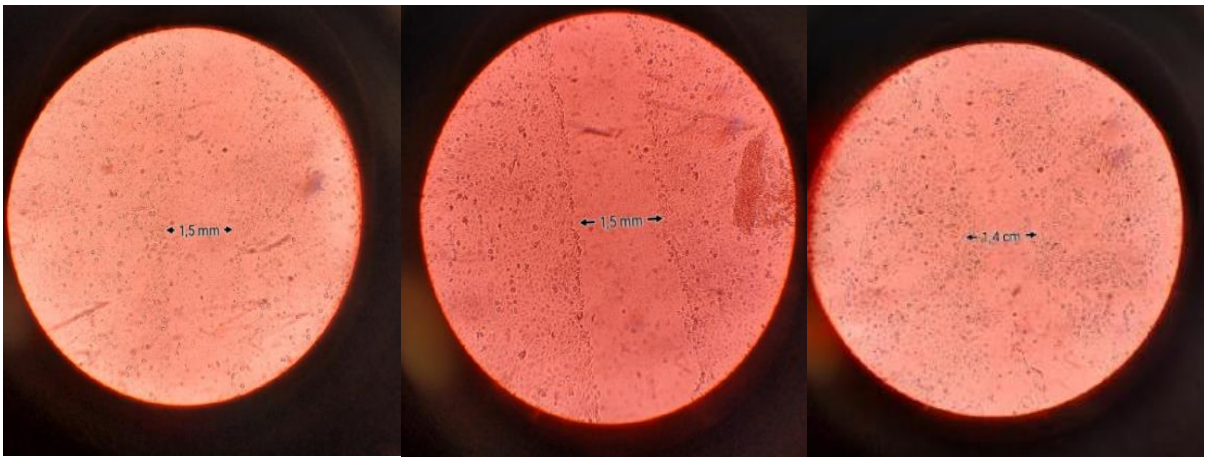
Kontrola	1,5%	1%	1%	0,5%
1,5	1,4	1,5	1,5	1,5
1,5	1,6	1,5	1,4	1,5
1,4	1,4	1,4	1,5	1,4

Tablica 9. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 2. dan *scratch* testa

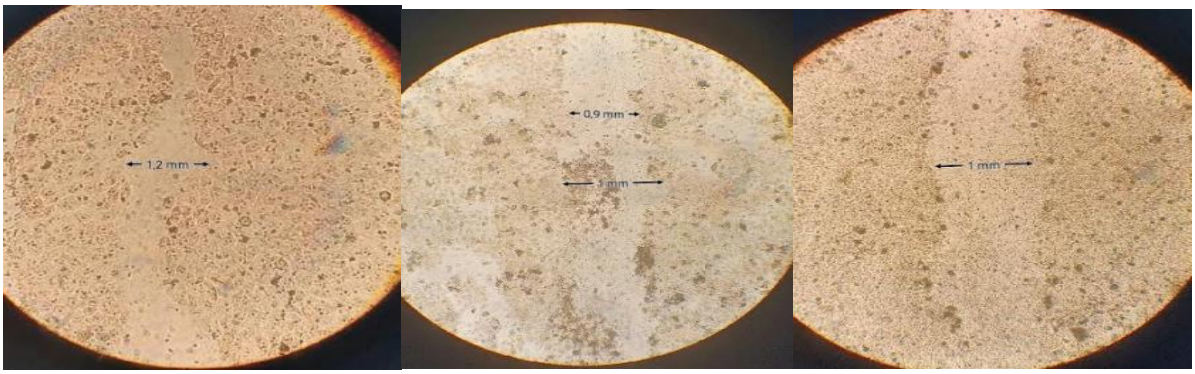
Kontrola	1,5%	1%	1%	0,5%
1,3	0,4	0,5	0,4	0,7
1,5	0,8	0,5	0,4	0,7
1,5	0,5	0,6	0,6	0,6

Tablica 10. Vrijednosti izmjerenih rana u mm, 3. dan scratch testa

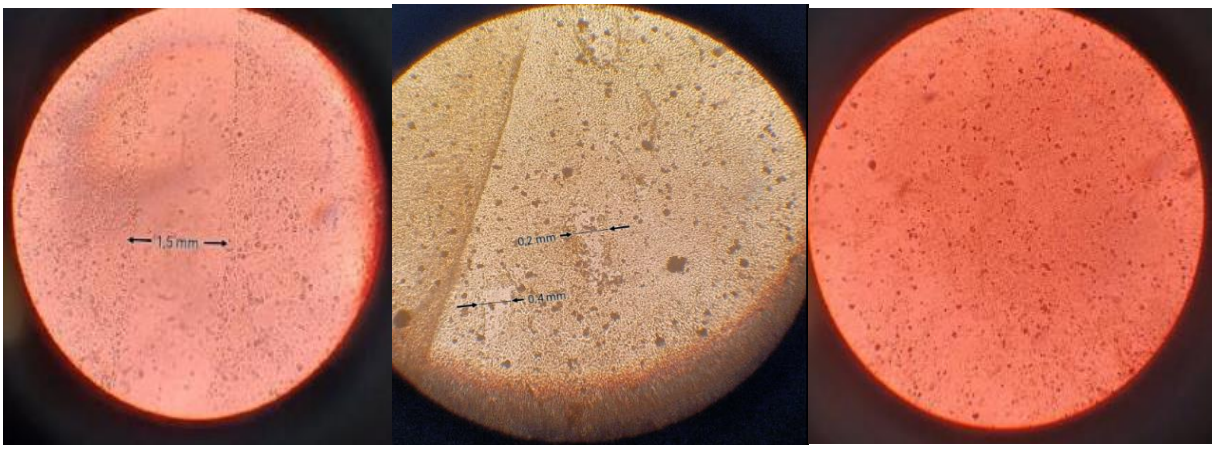
Kontrola
1,2
1
0,9



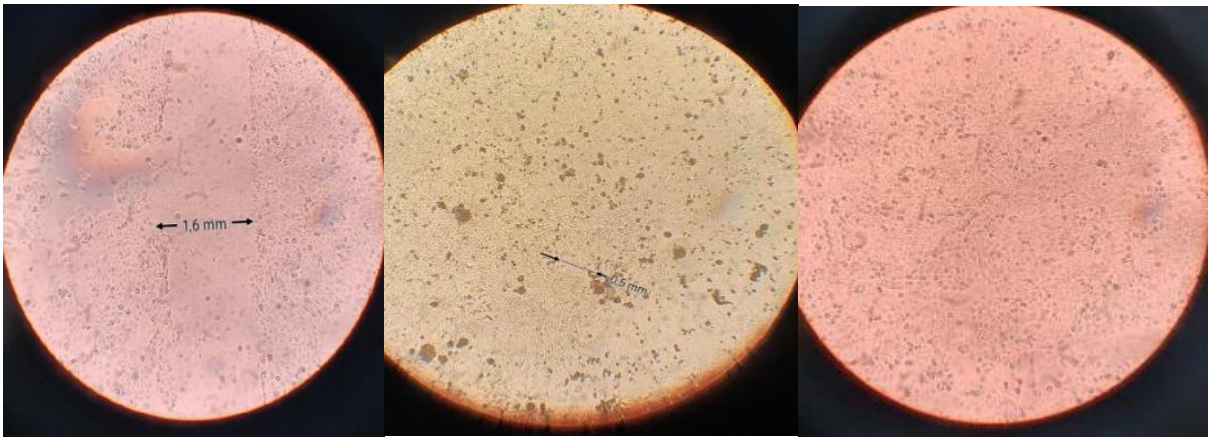
Slika 12. Stanična kultura tretirana s kontrolama A, B i C (s lijeva na desno) prvog dana *scratch* testa



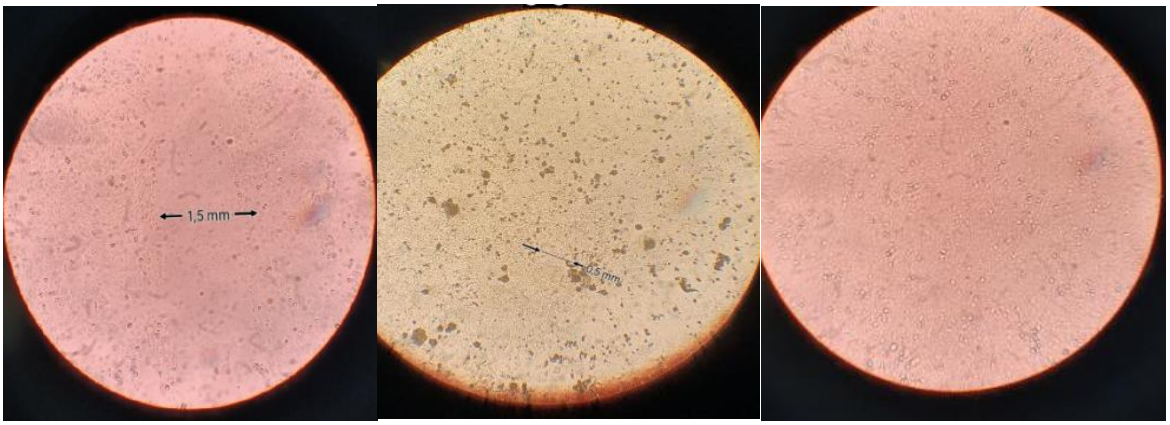
Slika 13. Stanična kultura tretirana s kontrolama A, B i C (s lijeva na desno) drugog dana *scratch* testa



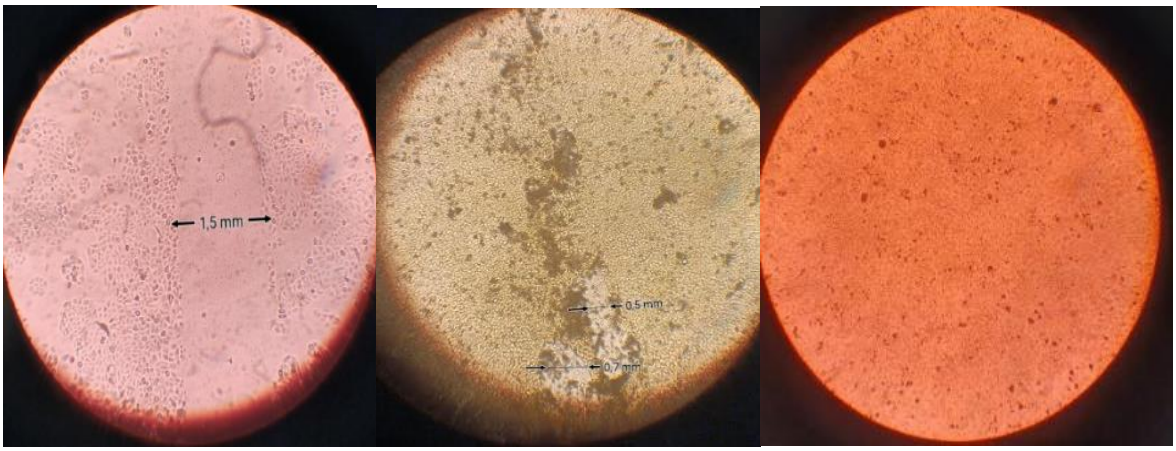
Slika 14. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



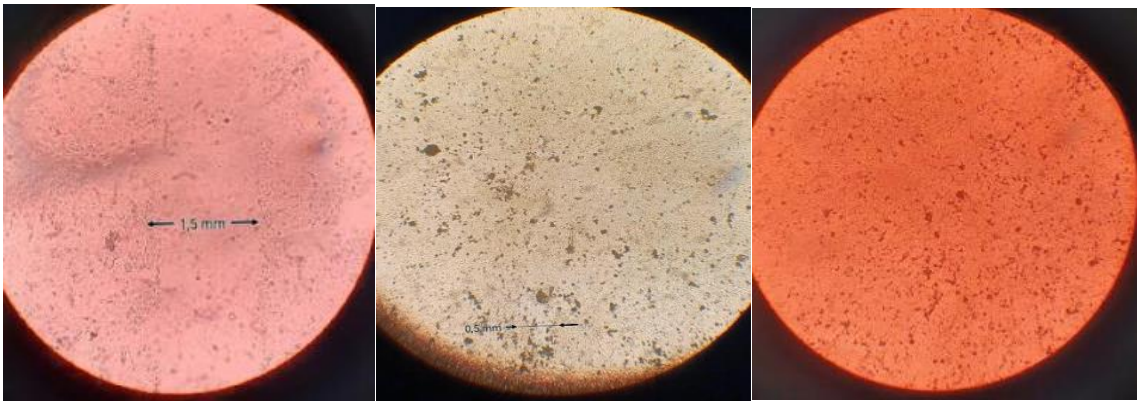
Slika 15. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



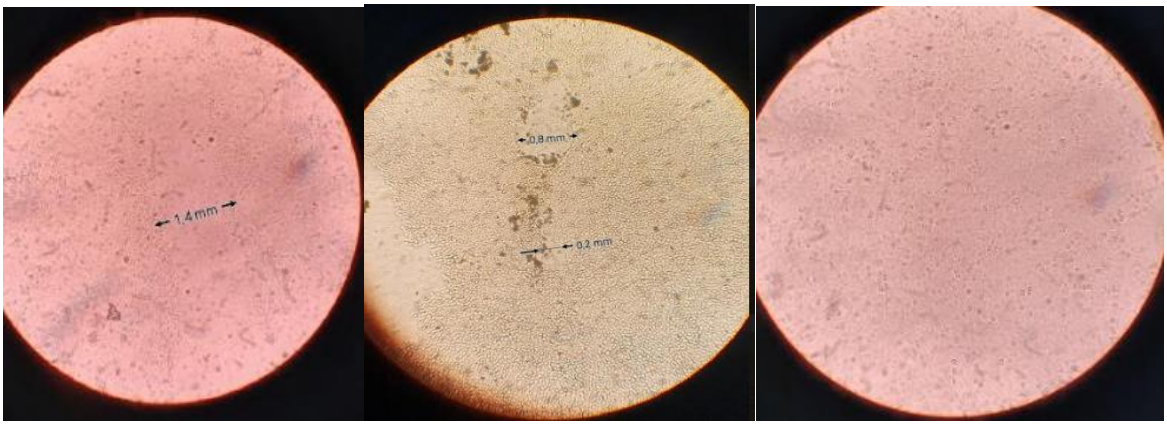
Slika 16. Stanična kultura tretirana s 1.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



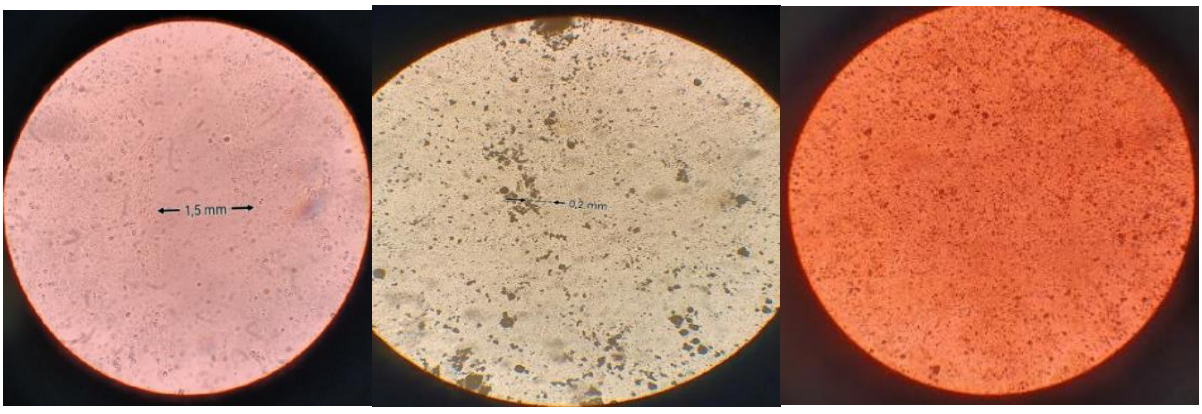
Slika 17. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



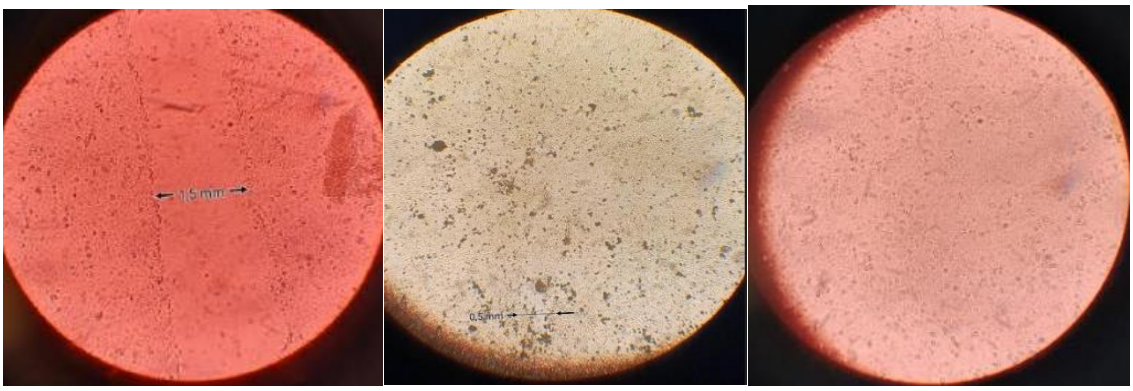
Slika 18. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



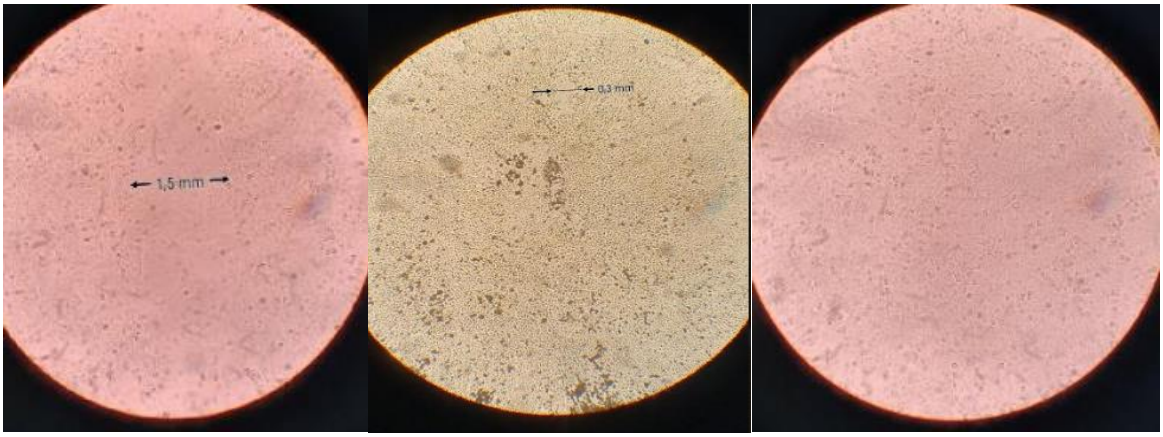
Slika 19. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



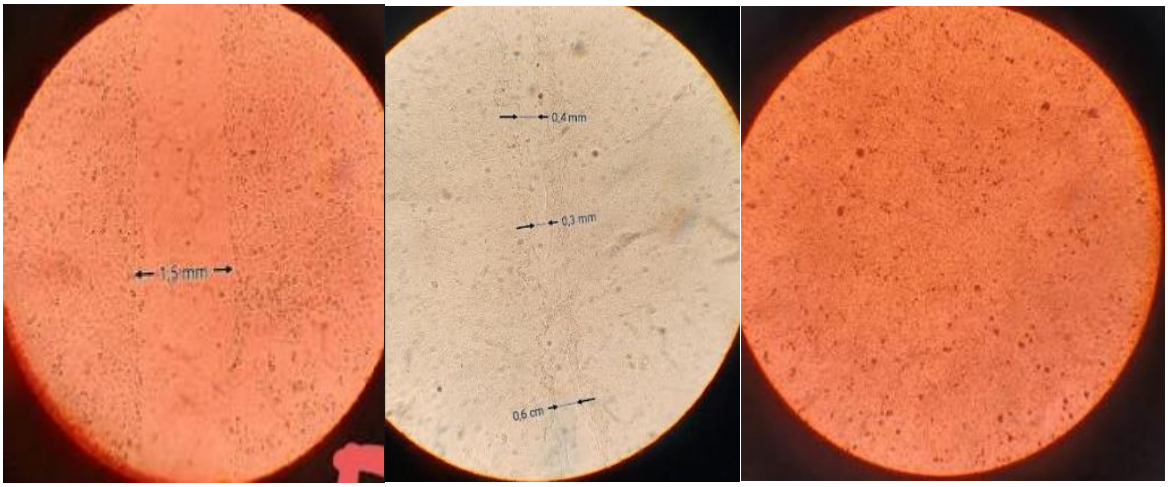
Slika 20. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



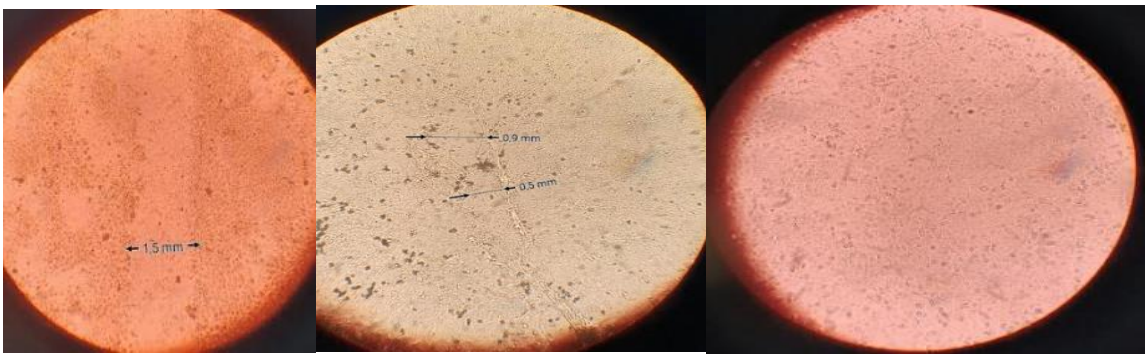
Slika 21. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



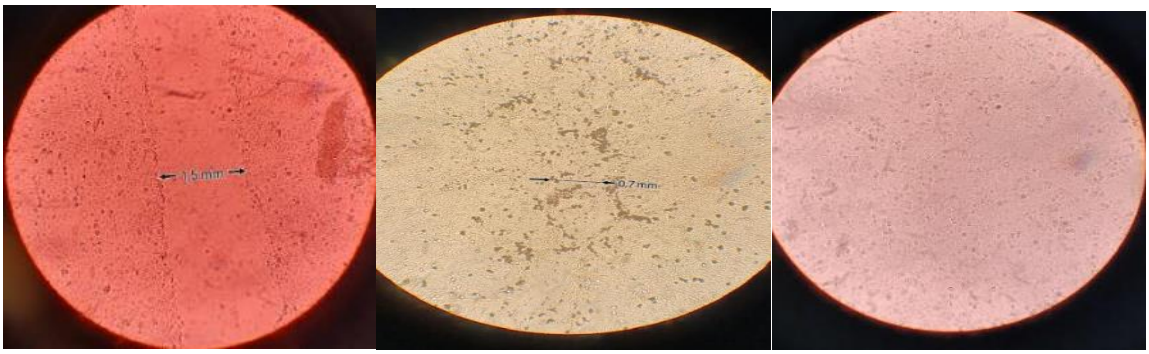
Slika 22. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



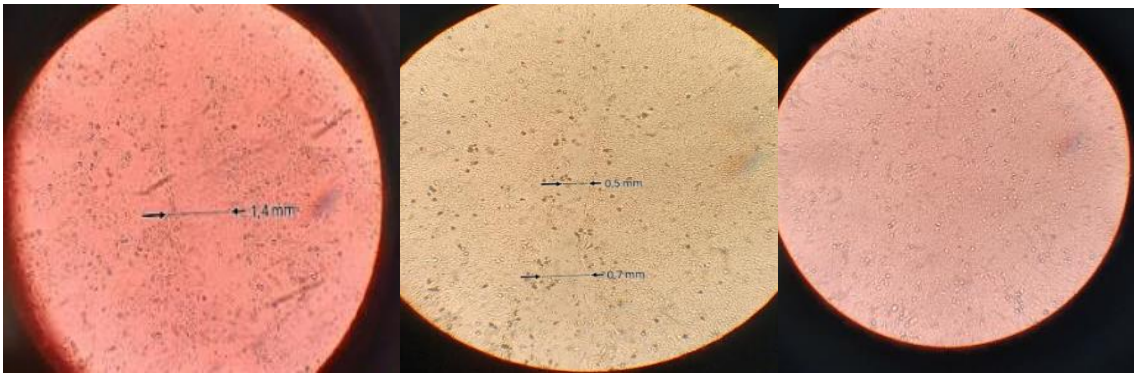
Slika 23. Stanična kultura tretirana s 1% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



Slika 24. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



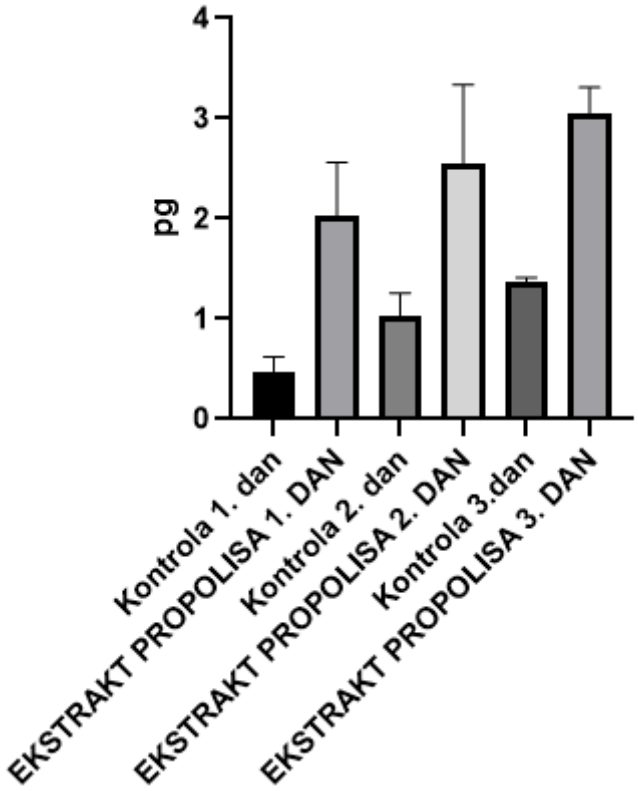
Slika 25. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana



Slika 26. Stanična kultura tretirana s 0.5% otopinom ekstrakta propolisa, očitavanje rezultata tijekom 3 uzastopna dana

4.5. ODREĐIVANJE INTERLEUKINA 6- IMUNOENZIMNOM METODOM

Spektrofotometrijski na valnoj duljini 650 nm određena je apsorbancija standarda. Nakon što je standard dosegao 0.5- 0.6, stop otopina je dodana u sve jažice. Intenzitet obojenja mjeren je za sve jažice na valnoj duljini 450 nm. Baždarna krivulja konsturira se s poznatim apsorbancijama standarda na osi ordinati i koncentriranog humanog IL-6 na apscisi. Slika 27. prikazuje količinu interleukina-6 u jažicama s 70 000 stanica, tretiranih s koncentriranim otopinama 1., 2. i 3. dan u usporedbi s jažicama tretiranih kontrolama A, B i C.



Slika 27. IL-6 u jažicama tretiranih kontrolama A, B i C u usporedbi sa staničnim kulturama tretiranim koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa 1., 2. i 3. dan

5. RASPRAVA

Sastav i učinkovitost ekstrakta propolisa ovise, među ostalim, o izboru otapala prilikom ekstrakcije (ŠURAN i sur., 2021.). U početnom ekstraktu propolisa izmjerene su visoke koncentracije markera, budući da je ipak bila riječ o incijalnom ekstraktu koji se dalje standardizira razrjeđivanjem (RADIĆ i sur., 2020). Takav, inicijalni ekstrakt se koristio u svim ispitivanjima u ovom istraživanju, u navedenim razrjeđenim koncentracijama.

Antimikrobni učinak ekstrakta propolisa ispitan je na 7 bakterijskih te 6 gljivičnih kultura. Propolis antimikrobno i antimikotički djeluje na gram-pozitivne bakterije, gram-negativne bakterije, spore gljivica i virusa. (MIGUEL i ANTUNES, 2011.). Dokazano je da ekstrakt propolisa pokazuje antimikrobni utjecaj na gram pozitivne bakterije. Minimalna inhibicijska koncentracija određena na gram pozitivnim bakterijama dokazuje antimikrobnu učinkovitost prema oba soja *Bacillus substilis* (ATCC 6603, 6630), *Enterococcus hirae* (ATCC 8043) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Za sve 4 bakterije minimalna inhibicijska koncentracija iznosila je 1,87 mg/mL. Odstupanja u skupini bacila pokazuje *Bacillus cereus* (ATCC 11778) kojemu MIK iznosi 7,5 mg/mL što je 4 puta manje razrijeđenje u usporedbi s *Bacillus substilis* (ATCC 6603, 6630). Na skupinu fekalnih bakterija propolis dobro djeluje na *Enterococcus hirae* (ATCC 8043) dok na *Enterococcus fecalis* (ATCC 9212) pokazuje slabije djelovanje. MIK ispitanog antimikrobnog učinka propolisa na *Enterococcus fecalis* (ATCC 9212) iznosila je 3,75 mg/mL što je dvostruko manje razjeđenje od *Enterococcus hirae* (ATCC 8043) bakterije iz iste skupine. Dokazano je da ekstrakt propolisa pokazuje antimikrobni učinak prema gram-negativnim bakterijama. Prema gljivicama pokazuje antimikotični učinak. MIK gram-negativnih bakterija *Escherichia coli* (ATCC 8739) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) iznosila je 0,468 mg/mL. Prema najnižoj vrijednosti MIK za bakterije *Escherichia coli* (ATCC 8739) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) dokazan je najbolji antimikrobni učinak. Izuzetak čini soj *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) čiji je MIK dvostruko manji, a iznosi 0,93 mg/mL. U oba soja gljivica *Candida albicans* (ATCCC 10231, 90028) minimalna inhibitorna koncentracija je iznosila 0,93 mg/mL što predstavlja najveću vrijednost. MIK *Candida crusei* (ATCC 14243) i *Candida kefyr* (ATCC 2572) iznosio je 0,468 mg/mL. Najniža vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije dokazana je kod *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Issatchenkia orientalis* (ATCC 6358) i *Candida tropicalis* (ATCC 750) koja iznosi 0,23 mg/mL. Antimikrobno djelovanje propolisa pripisuje se povezanosti između nekoliko čimbenika. Neki od čimbenika su visoka koncentracija šećera, kiselosti, antimikrobnih peptida te flavonoida i fenolne kiseline (BODEKER I SUR., 1999.). Nekoliko studija dokazale su

baktericidno djelovanje propolisa protiv širokog spektra rezistentnih bakterija. Dokazano je da propolis inhibira i uklanja stvaranje biofilma kod životinja i ljudi (KWAKMAN I SUR., 2010.). Upravo na temelju rezultata minimalne inhibitorne koncentracije, pretpostavljena je sigurnost u korištenju 10%, 5% te 2,5% koncentracije otopine propolisa.

MTT testom citotoksičnosti i varijabilnosti potvrđena je sigurnost i netoksičnost 10%, 5% i 2,5% otopine ekstrakta propolisa. Jažice tretirane koncentracijama 10%, 5% i 2,5% otopinama propolisa ne pokazuju značajni pad u intenzitetu obojenja u usporedbi s jažicama tretiranih kontrolama A, B i C. Odnosno, podjednake su razine metabolički aktivnih stanica koje reduciraju MTT sol u formazan ljubičaste boje u svim tretiranim skupinama. Isto je dokazano i u drugom MTT testu kojega smo proveli. Time je potvrđeno da ekstrakt propolisa nije citotoksičan te ne izaziva uginuće stanica. Ipak, količina pigmenata u visoko koncentriranim otopinama propolisa onemogućava poticanje migracije stanica što je dokazano na 200 000 stanica po jažici. Zbog toga bilo je potrebno smanjiti koncentracije otopina propolisa.

Biološka aktivnost propolisa poboljšava dijeljenje stanica kože i aktivaciju rasta čime pridonosi bržem cijeljenju rana (MARTINOTTI I RANZATO, 2015.). Propolis inhibira aktivnost COXa-a iz homogenih pluća štakora tretiranih fiziološkom otopinom ili LPS-om (ROSSI I SUR., 2002.). Protuupalno djeluje inhibirajući sintezu prostaglandina, NADPH-oksidaze i tirozin-protein kinaze (CHO I SUR., 2014.). Propolis djeluje imunostimulacijski na makrofage te povećava brzinu cijeljenja rana i epitelizaciju dijabetičkih rana kod glodavaca (TORETI I SUR., 2013.). Također pridonosi normalizaciji priljeva makrofaga u ranu.

S obzirom na rezultate *scratch* testa 1,5%, 1% i 0,5% koncentrirane otopine propolisa postigle su statistički značajno brže cijeljenje rana u usporedbi s jažicama tretiranim kontrolama A, B i C. Upotrebom t testa između kontrole 2. dana i propolisom tretiranih stanica, utvrđena je statistički značajna razlika u cijeljenju rana ($p<0,0032$). Tijekom vremenskog perioda od 3 dana, statistički značajno je povećanje rasta tretiranih stanica propolisom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Isto tako, upotrebom ANOVA testa utvrđena je statistički značajna razlika između kontrola i stanica tretiranih 1.5%, 1% i 0.5% koncentriranim otopinama ekstrakta propolisa ($p<0.0001$). Najbolje vrijednosti cijeljenja imale su stanice tretirane s 1,5% i 1% otopinom propolisa. Najniža vrijednost razlike 1. početnog dana i migracije stanica iznosi 0,4mm, a isto dokazuje da 1% otopina propolisa potiče najbrže cijeljenje rana.

Imunomodulatornim djelovanjem propolis povećava oslobađanje vazoaktivnih posrednika poput metabolita arahidonske kiseline. Zbog povećanog priljeva trombocita i

degranulacije istih, dolazi do oslobađanja faktora rasta. Propolis povećava lučenje citokina te izaziva imunološku reakciju bez nuspojava (MARTINOTTI i RANZATO, 2013.). Lučenje citokina povećava se tijekom vremena cijeljenja rane. Faktori rasta koji se oslobađaju degranulacijom trombocita su: EGF (engl. *epidermal growth factor*), PDGF (engl. *platelet – derived growth factor*) i TGF-B (engl. *transforming growth factor- B*). Povećanjem diferencijacije monocita u makrofage dolazi do otpuštanja proupalnih citokina poput IL-1, IL-6 te faktora rasta FGF (engl. *fibroblast growth factor*).

ELISA metodom izolacije interleukina 6 dokazan je porast IL-6 u jažicama tretiranih ekstraktima propolisa. ANOVA metodom dokazan je statistički značajan porast IL-6 ($p< 0.0001$) između jažica tretiranih 1.5%, 1% i 0,5% otopinama propolisa te kontrolama A, B i C tijekom 3 dana. Proupalni citokin IL-6 stimulira migraciju stanica keratinocita i zatvaranje rane u rani in vitro modela (NAKAMURA i NISHIDA, 1999.). IL-6 je složeni citokin povezan sa širokim rasponom učinaka. Korištenjem t- testa dokazan je statistički značajan rast ($p< 0.0086$) između kontrole 2. dana i jažica tretiranih s 1.5%, 1% i 0.5% otopinom ekstrakta propolisa. On je ključni modulator upalnog i reparativnog procesa: uključen je u diferencijaciju, aktivaciju i proliferaciju leukocita, endotelnih stanica, keratinocita i fibroblasta. Otpušten je kao odgovor na ozljedu, i inducira oslobađanje proupalnih citokina iz tkivnih rezidentnih makrofaga, keratinocita, endotelnih stanica i stromalnih stanica. Utvrđeno je također da IL-6 inducira kemotaksiju leukocita u ranu (WEISSENBACH i sur., 2004.). Kako upala napreduje, signalizacija IL-6 odgovorna je za prelazak u reparativnu fazu. Dotokom neutrofila u ranu započinje čišćenje krhotina, a također povećava topljivi IL-6-receptor α (sIL-6Rα) u rani. Time slijedi prijelaz iz upalne faze zacjeljivanja rane u fazu proliferacije, budući da kompleksi IL-6 / IL-6Rα započinju signaliziranje kroz sveprisutni transmembranski receptor gp130. Stoga se povećava endotelna ekspresija IL-6 i monocitnog kemoatraktanta proteina 1 (MCP-1) (HIRST i sur., 2001.). IL-6 regulira polarizaciju makrofaga M2, vjerojatno povećanom regulacijom receptora IL-4 (MASUKI i sur., 2016.). M2 stanice važne su za kasnu fazu popravljanja rana, eksprimirajući TGF-β i IL-10. IL-6 regulira diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste putem parakrine ekspresije TGF-β na mjestu rane (DUFOUR i sur., 2018.) te izravno u fibroblastima. Interleukin inicira stvaranje granulacijskog tkiva (BROUGHTON i sur., 2006.). Kako faza granulacije napreduje, prevladavajuće stanice su fibroblasti, endotelne stanice, periciti i keratinociti koji popunjavaju ranu (DIEGELMANN i EVANS, 2004.).

PILLAI i sur. dokazali su da propolis ubrzava epitelnu reorganizaciju. Zatvaranje rane od početne faze i kontrakcije rane bilo je ubrzano gotovo za 90% u usporedbi s kontrolnom

skupinom. Angiogeni i mitogeni potencijal ekstrakta propolisa na mjesto rane značajno utječe na aktivnost zacjeljivanja rane (PILLAI i sur., 2010.). Značajno povišena razina hidroksiprolina primjećena je kod stanica tretiranih propolisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (PILLAI i sur., 2010.). Hidroksiprolin je aminokiselina koja se nalazi samo u kolagenu i izravno je proporcionalna cijeljenju rana. Promatrano povećanje sinteze kolagena tretiranih propolisom značajno pridonose ozdravljenju tkiva. Uronska kiselina u rani povlači fibroblaste i potiče sintezu kolagena osiguravajući više tekućine što olakšava veću mobilnost stanica, rano preoblikovanje te pomaže zacjeljivanju (HU i sur., 2003.). Proliferacijska faza regulirana je faktorima rasta kao što su FGF, TGF-B, PDGF I VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*). Fibroblasti luče TGF-B1 koji posljedično utječe na reepitelizaciju, fibroplaziju i angiogenezu. Pretvorbu fibroblasta u miofibroblaste potiče TGF-B1 i PDGF. Zbog niske koncentracije kisika dolazi do aktivacije glavnog transkripcijskog faktora HIF-a. HIF je hipoksijom induciran čimbenik koji regulira lučenje faktora VEGF (engl. vascular endothelial growth factor). Faktorom VEGF potiče se brže cijeljenje rana. Nakon potpune remodelacije epitelnog sloja kože dolazi do inhibicije VEGF-a čime se smanjuje angiogeneza.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s prethodnim studijama u kojima su tradicionalni, najčešće alkoholni ekstrakti propolisa pokazali potencijal kao modulatori rana. Standardizirani bezalkoholni ekstrakt koji se koristio u ovom istraživanju potaknuo je cijeljenje keratinocita nakon izazvane ozljede (*scratch*), te je potaknuo oslobađanje IL-6, važnog medijatora cijeljenja. Korištenjem bezalkoholnog ekstrakta propolisa potiče se oslobađanje IL-6 koji je ključan modulator signalizacije prelaska upalne u reparativnu fazu cijeljenja rane. Time bi se povećala razina proupalnih citokina u kroničnim ranama i ubrzalo cijeljenje istih. Daljnjim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima mogao bi se detaljnije objasniti mehanizam djelovanja propolisa na cijeljenje, kao i primjena ovog bezalkoholnog ekstrakta propolisa u pripravcima za tretman rana.

6. ZAKLJUČCI

Inovativni, bezalkoholni ekstrakt propolisa potiče cijeljenje rana te djeluje protuupalno, imunomodulatorno, antimikrobno i antimikotično. Ispitan je antimikrobni učinak ekstrakta propolisa na 7 bakterijskih te 6 gljivičnih kultura.

Određivanjem antimikrobnog učinka, možemo zaključiti:

- Dokazan je antimikrobni učinak bezalkoholnog ekstrakta propolisa na kulturama gram pozitivnih i gram negativnih bakterija te gljivica
- MTT testom dokazana je neškodljivost bezalkoholnog ekstrakta propolisa prema staničnoj kulturi HaCaT
- Koncentracije otopine ekstrakta propolisa 10%, 5% i 2.5% nisu citotoksične

S obzirom na rezultate cijeljenja rana, zaključujem:

- 1.5%, 1% i 0.5% otopine bezalkoholnog ekstrakta propolisa postižu statistički značajno brže cijeljenje rana u uporedbi sa staničnim kulturama tretiranim kontrolama A, B i C
- Najbolje vrijednosti cijeljenja rana postigle su 1.5% i 1% bezalkoholna otopina ekstrakta propolisa
- Bezalkoholni ekstrakt propolisa potaknuo je lučenje IL-6

7. LITERATURA

1. AGYARE C., N. OSAFLO, Y. D. BOAKYE (2018): Wound Healing- Current Perspectives, UK, 23-33
2. AHN MR., K. KUNIMASA, T. OHTA (2007): Suppression of tumor induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer Lett 252, 235–243
3. ALBUQUERQUE-JUNIOR R. L., A. L. S. BARETTO, J. A. PIRES, F. P. REIS, S. O. LIMA, M. A. G. RIBEIRO (2009): Effect of bovine type-1-collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. Int. J. Morphol., 27(4), 1105-1110
4. ALENCAR S.M., T.L.C. OLDONI., M.L. CASTRO, I.S.R. CABRAL, C.M. COSTA-NETO, J.A. CURY, P.L. ROSALEN, M. IKEGAKI (2007): Chemical composition and biological activity of a new typle of Brazilian propolis: red propolis. J. Ethnopharmacol 133, 278-283
5. ANUMOLU SS., A.R. MENJOGE., M. DESHMUKH., D.GERECKE, S. STEIN, J. LASKIN, P. J. SINKO (2011): Doxycycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries. Biomaterials, 1204-1217
6. ASHRAF M. ABU-SEIDA (2015): Effect of Propolis on Experimental Cutaneous Woung Healing in Dogs. Vet Med Int. 2015, 1-4
7. B. S. NAYAK., L. M. P. PEREIRA (2006): Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. BMC, 6:41 doi:10.1186/1472-6882-6-41
8. BACHIEGA T.F., C. L. ORSATTI, A. C. PAGLIARONE, J. M. SFORCIN (2012): The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. Phytother. Res. 26(9), 1308- 1313
9. BANKOVA V., G. BOUDOUROVA-KRASTEVA, J. M. SFORCIN (1999): Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. Z Naturforsch 54, 401–405
10. BANSKOTA A.H., Y. TEZUKA, K. ADNYANA, K. MIDORIKAWA, K. MATSUSHIGE, D. MESSAGE, A. HUERTAS, S. KADOTA (2011): Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J. Ethnopharmacol 72 (1-2), 239–246

11. BERRETTA A.A., A. P. NASCIMENTO, P. C. P. BUENO, M. OLIVEIRA LIMA LEITE VAZ, J. M. MARCHETTI (2012): Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. Int. J. Biol. Sci 8(4), 512-521
12. BLAŽEVIĆ F., T. MILEKIĆ (2015): Utjecaj lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom na cijeljenje rane in vitro. Dizertacija, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb
13. BOSIO K., C. AVANZINI, A. D'AVOLIO, O. OZINO, D. SAVOIA (2001): In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. Lett Appl Microbiol 31 (2), 174-783
14. BOUDREAU M.D., F.A. BELAND (2006): An evaluation of the biological and toxicological properties of Aloe barbadensis. J. Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxical 24(1), 103-154
15. BOURY-JAMOT M., J. DARASPE, F. BONTE, E. PERRIER, S. SCHNEBERT, M. DUMAS, J. M. VERBAVATZ (2006): Skin aquaporins: Function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. Handb Exp Pharmacol 190, 205-217
16. BROUGHTON G., J. E. JANIS, C. E. ATTINGER (2006): The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg 117, 12S-34S
17. BUENO – SILVA, B., S. M. ALENCAR, H. KOO, M. IKEGAKI, G. V. SILVA, M. IKEGAKI, G. V. J. 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
18. ČAJKOVAC M. (2000): Kozmitologija, Jastrebarsko, Naklada Slap, str 25-31
19. CALEY MP., V. L. C. MARTINS, E. A. O'TOOLE (2015): Metalloproteinases and wound healing. Advances in Wound Care 4, 225-234
20. CHO M.S., W. S. PARK, W. K. JUNG, Z. QIAN, D. S. LEE, J. S. CHOI, D. Y. LEE, S.G. PARK, S. K. SEO, H. J. KIM, J. Y. WON, B. C. Y. WHAN CHOI (2014): Caggeic acid phenethyl ester promotes anti inflammatory effects by inhibiting MAPK and NF-Kb signaling in activated HMC-1 human mast cells. Pharm Biol 52(7), 926-932
21. CLARK RA, J. M. LANIGAN, P. DELLAPELLE, E. MANSEAU, H. F. DVORAK, R. B. COLVIN (1989): Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelizalization. J. Invest dermatol 79 (5), 264-699

22. DALEPRANE J.B., D. S. ABDALIA (2013): Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. Evid Based Complement Alternat Med 2013, 75135. doi: 10.1155/2013/175135.
23. DE MARCO, M. PICCIONI, R. PAGIOTTI, D. PIETRELLA (2017): Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar reins versus *Pseudomonas aeruginosa*. Evid Based Complement Alternat Med 2017, 5163575
24. DEGIM Z., N. CELEBI, C. ALEMDAROGLU, M. DEVECI., C. OZOGUL (2011): Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. Int Wound J 8, 343–354
25. DIAGN JMB., A. GUPTA (2016): Wound healing: Assessment by various markers. Journal of Molecular Biomarkers. 8(2), 8-10
26. DIEGELMANN R. F., M. C. EVANS (2004): Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci 9, 283-289
27. DUFOUR A.M., M. ALVAREZ, B. RUSSO, C. CHIZZOLINI (2018): Interleukin-6 and Type-I Collagen Production by Systemic Sclerosis Fibroblasts Are Differentially Regulated by Interleukin-17A in the Presence of Transforming Growth Factor-Beta 1. Front Immunol 9, doi: 10.3389/fimmu.2018.01865
28. FARINES V., M. C. MONJE, J. P. TELO, E. HNAWIA, SAUVAIN M., NEPVEU F., (2004): Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors. Anal. Chim 513, 103–111
29. FREIRES I. A., V. C. P. P. QUEIROZ, V. F. FURLETTI., M. IKEGAKI, S.M. ALENCAR, M. C. T. DUARTE., P. L. ROSALEN (2016): Chemical composition and antifugal potential of Brazilian propolis against Candida spp. J. Mycol Med 26, 122-132
30. GALLUCCI RM., P. P. SIMEONOVA, J. M. MATHESON, C. KOMMINENI, J. L. GURIEL, LUSTER, T. SUGAWARA (2000): Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6–deficient and immunosup-pressed mice, FASEB Journal 14, 2525-2531
31. GAVANJI S., B. LARKI (2015):Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on Candida albicans. Chin J integr Med 23, 201- 207
32. GHISALBERTI E.L., (1979): Propolis: A Review, BEE World 60, 59-84
33. GROOT A. C. (2013): Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. Dermatitis 24, 263- 829
34. GUO S., L. A. DIPIERTO (1984): Factors affecting wound healing. J. Dent Res 89, 219-299

35. HASHEMI S.A., S. A. MADANI, S. ABEDIANKENARI (2015): The review on Properties of Aloa Vera in Healing of Cutaneous Wounds. Biomed Res Int 2015, 714216, doi: 10.1155/2015/714216
36. HOPKINSON I. (1992): I. Molecular Components of the Extracellular Matrix. J Wound Care. J. Wound Care 1, 52-54
37. HU X., S. LIU, G. ZHOU, Y. HUANG, Z. XIE, X. JING (2014): Electrospinning of polymeric nanofivers for drug develivery applications. J Control Release 185, 12-21
38. HULJEV D., A. GAJIĆ (2011): Debridement. Acta Med Croatica 66, 63-80
39. *HURST S.M., T. S. WILKINSON, R. M. MCLOUGHLIN, S. JONES, S. HORIUCHI, N. YAMAMOTO, S. ROSE-JOHN, G. M. FULLER, N. TOPLEY, S. A. JONES (2001):* Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity 14, 705–714
40. INUI S., A. HATANO, M. YOSHINO, T. HOSOYA, Y. SHIMAMURA, S. MASUDA S. TAZAWA, Y. ARAKI, KUMAZAWA (2014): Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. Nad Prod Res 28, 1293-1296
41. ISMAIL Z.B., M. A. ALSHEHABAT, W. HANNANEH, M. DARADKA, J. H. ALI, E. K. EL-NAJJAR (2015): Recent advances in topical wound healing products with special reference to honey. Pharma Biosc 65, 76-83
42. IVANOVSKA ND., V. B. DIMOV, V. S. BANKOVA, S. S. POPOV (1995): Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. J Ethnopharmacol 47, 145–147
43. JABLONSKA- TRYPUC A., M. MATEJCZYSK, S. ROSOCHACKI (2016): Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anti-cancer drugs. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2016, 177-183
44. KUREK-GORECKA A., A. R. STOJKO, M. GORECKI, J. STOJKO, M. SOSADA, G. S. ZIEBA (2013): Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. Molecules 19, 78- 101
45. KWIENCINSKA-PIROG J., K. SKOWRON, A. SNIEGOWSKA, J. PRZEKWAS, M. BALCEREK, D. ZALUSKI, E. GOSPODAREK-KOMKOWSKA (2018): The impact of ethanol extract of propolis on biofilm forming by Proteus Mirabilis strains isolated from chronic wounds infections. Nat Prod Red 33, 3293-3297

46. LAWRENCE T. (2009): The nuclear factor-kappa B pathway and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, 001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651
47. LOBMANN R., C. ZEMLIN, M. MOTZKAU, K. RESCHKE, H. LEHNERT, (2006): Expression of matrix metal-loproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absor-bent dressing. Journal of Diabetes and its Complications 243, 329-335
48. LOPEZ B. G. C., E. M. SCHMIDT, M. N. EBERLIN, A. C. H. F. SAWAYA (2014): Phytochemical markers of different types of red propolis. Food Chem 146, 174-180
49. MACHADO B.A.S., R. P. D. SILVA, A. BARRETO, S. S. COSTA, D. F. SILVA, H. N. BRANDAO, J. L. C. ROCHA, O. A. DELLAGOSTIN, J. A. P. HENRIQUES, M. A. UMSZA-GUEZ, F. F. PADIHLA (2016): Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic exctraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil, Plos One 11, 0145954. doi: 10.1371/journal.pone.0145954
50. MARTENEZ-HERNANDEZ (1994): Repair, regeneration and fibrosis, Pathology. Lippincott-Raven USA 1999, 77-103
51. MARTINOTTI S., E. RANZATO (2015): Propolis: a new frontier for wound healing? Burns Trauma 3, doi: 10.1186/s41038-015-0010
52. MARTINOTTI S., G. PELLAVIO, U. LAFORENZA, E. RANZATO (2019): Propolis Induces AQP3 Expression: A Possible Way of Action in Wound Healing. Molecules 24, 1544, doi:10.3390/molecules24081544
53. MASSARO C. F., J. B. SIMPSON, D. POWELL, P. BROOKS (2015): Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (Apis mellifera ligustica) propolis from subtropical. Sci. Nat. 2015, 102-168
54. MASUKI H., T. OKUDERA, T. WATANEBE, M. SUZUKI, K. NISHIYAMA, H. OKUDERA, K. NAKATA, K. UEMATSU, C. SU (2016): Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). Int. J. Implant. Dent 19, doi: 10.1186/s40729-016-0052-4.
55. MIGUEL M. G., S. NUNES, S. A. DANDLEN, A. M. CAVACO, M. D. ANTUNES (2010): Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. Food Chem Toxicol 48, 3418-3423
56. MINOR (1989): Collagen metabolism: A comparison of disease of colagen and diseases affecting collagen. Am J Pathol 98, 225-280

57. MOREIRA L., L. G. DIAS, J. A. PEREIRA, L. ESTEVINHO (2008): Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food Chem Toxicol 46, 3482-3485
58. MUANGMAN P., C. PUNDEE, S. OPASANON, S. MUANGMAN (2010): A prospective, randomized trial of silver containing hydrofiber dressing versus 1% silver sulfadiazine for the treatment of partial thickness burns. Int Wound J. 7, 241-246
59. MULI EM., J. M. MAINGI, (2007): Antibacterial activity of Apis mellifera L. propolis collected in three regions of Kenya. Int Wound J 9, 655-663
60. NG M.F. (2010): The role of mast cells in wound healing. Int Wound J 17, 55-61
61. OLCZYK P., K. KOMOSINSKA-VASSEV, G. WISOWSKI, L. MENCNER, J. STOJKO, E. M. KOZMA (2013): Propolis modulates fibronectin expression in the matrix of thermal injury. Biomed Res Int 2014, 748101. doi: 10.1155/2014/748101
62. ORHAN H., S. MAROL, I. F. HEPSEN, G. SAHIN (1999.): Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. Toxicology 139, 219- 232
63. ORSI R.O., J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI, V. BANKOVA (2005): Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against Salmonella Typhimurium. Int Immunopharmacol 2005, 359- 368
64. ORYAN A., E. ALEMZADEH, A. MOSHIRI, (2018): Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. Biomed Pharmacother 98, 469-483
65. PARK Y.K., S. M. ALENCAR, C. L. AGUIAR (2002): Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J. Agric. Food Chem 576, 2502-2506
66. PELLATI, F., F. P. PRENCIPE, D. BERTELLI, S. BENVENUTI (2013): An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis bymicrowave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. J. Pharm. Biomed. 81– 82, 126–132.
67. PEREIRA R.F., P. J. BARTOLO (2016): Traditional Therapies for Skin Wound Healing, Adv Wound Care 1, 208-229
68. PILLAI S.I., P. PALSAMY, S. SUBRAMANIAN, M. KANDASWAMY (2010): Wound healing properties of Indian propolis studied excision wound- induced rats. Pharma Bio 48, 1198-1206

69. POPOVA M., M. REYES, LE CONTE, V. BANKOVA (2007): Propolis chemical composition and honeybee resistance against Varroa destructor. Nat Prod Res 28, 788-794
70. PUČAR, GRČIĆ, PERNJAK, DETEL, VARLJEN (2017):Wound healing process and dipeptidyl peptidase IV. Medicina fluminensis 53, 4-15
71. RADIĆ, S., B. RADIĆ, J. ŠURAN (2020**):** LIQUID PROPOLIS EXTRACT, ITS FORMULATION AND USE THEREOF. WO/2020/169425. Antioxidants 2021, 10, 978. https://doi.org/10.3390/antiox10060978
72. RODRIGUES C.R.F., J. H. DIAS, J. G. SEMEDO, J. SILVA, A. B. F. FERRAZ, J. N. PICADA (2009): Mutagenic and genotoxic effects of Baccharis dracunculifolia. Nat Prod Res 45, 321-324
73. RUSSO A., R. LONGO, A. VANELLA (2002): Antioxidant activity of propolis : Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapia 21, doi: 10.1016/s0367-326x(02)00187-9
74. SFORCIN J. M., V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? J. Ethnopharmacol 133, 253-260
75. SFORCIN J.M., (2016): Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. Phytother Res 30, 894- 905
76. SFORCIN J.M., E. O. ORSI, V. BANKOVA (2005): Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. J. Ethnopharmacol 98, 301-305
77. SHAN YH., L. H. PENG, X. LIU, X. CHEN, J. XIONG, J. Q. GAO (2015): Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized wuth astragaloside IV induces healing and antiscar effects on burn wound. Int J Pharm 479, 291-301
78. SILICA S, N. A. KOCH, D. EVANGEL, S. CANADA (2005) :Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. J. Pharmacol Sci 99, 33–44
79. SIMONES L. M., L. E. GREGORIO, A. A. SILVA, M. L. SOURZA, A. E. AZZOLINI, J. K. BASTOS (2004): Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. J. Pharmacol Sci 94, 59–65
80. ŠURAN J., I. CEPANEC, T. MAŠEK, B. RADIĆ, S. RADIĆ, I. T. GAJGER, J. VLAINIĆ (2021): Propolis Extract and Its Bioactive Compounds—From Traditional

to Modern Extraction Technologies. Molecules 26, 2930. doi: 10.3390/molecules26102930.

81. TEIXEIRA E. W., D. MESSAGE, G. NEGRI, A. SALATINO, P. C. STRINGHETA (2010): Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. Evid Based Complement Alternat Med 7, 307-315
82. TORETI V.C., H. H. SATO, G. M. PASTORE, Y.K. PARK (2013): Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evid Based Complement Alternat Med 697390, doi: 10.1155/2013/697390.
83. VAN WILLSON (2013): Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. Methods Mol Bio, 1195:33-41, doi: 10.1007/7651_2013_42.
84. VNUK D., D. MATIČIĆ (2010): Veterinarska kirurgija s anesteziologijom, Medicinska naklada, Zagreb
85. WALTER J. B., J. C. TALBOT (1996): Wound Healing General Pathology, UK, 7th. Edition
86. WANG W., L. U. KONG JUN, Y. U. CHAO-HENG, QIAO-LING HUANG, D. U. YONG-ZHONG, (2019): Nano- drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. J. Nanobiotechnology 17, doi: 10.1186/s12951-019-0514-y.
87. WEISSENBACH M., T. CLAHSEN, C. WEBER, D. SPITZER, D. WIRTH, D. VESTWEBER, P. C. HEINRICH, F. SCHAPER (2004): Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. Eur. J. Immunol. 34, 2895–2906
88. WOJTYCKA R.D., M. KEPA, D. IDZIK, R. KUBINA, A. K. DZIK, A. DZIEDZIC, T. J. WASIK (2013): In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Polish Propolis against Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis Strains. Evid Based Complement Alternat Med 2013, 590703. doi: 10.1155/2013/590703 , S., B. RADIĆ, J. . WO/2020/169425.AGYARE, OSAFLO (2018): Biomarkers of Wound Healing

8. SAŽETAK

UČINAK EKSTRAKATA PROPOLISA NA MARKERE CIJELJENJA RANA U STANIČNOJ KULTURI KERATINOCITA

Propolis djeluje imunomodulatorno, antimikrobno, antioksidativno, analgetsko i protuupalno čime potiče brže cijeljenje rana. Važni spojevi u propolisu su flavonoidi, fenilpropenoidi te fenolične kiseline poput kumarične kiseline, kafeične kiseline te ferulične kiseline. Fenetil ester kofeinske kiseline (CAPE) imunosupresivno djeluje inhibirajući rast bakterija, sprječavajući staničnu podjelu. Antioksidativno djelovanje propolisa potiče visoka koncentracija polifenola i flavonoida. Bezalkoholni ekstrakt propolisa pokazuje antimikrobni utjecaj na gram pozitivne bakterije i gram negativne bakterije. Propolis pokazuje antimikotični učinak prema gljivicama. MTT testom citotoksičnosti dokazana je neškodljivost propolisa prema stanicama. S obzirom na rezultate *scratch* testa 1,5%, 1% i 0,5% koncentrirane otopine propolisa postigle su statistički značajno brže cijeljenje rana u usporedbi s jažicama tretiranim kontrolama A, B i C. Upotrebom t testa između kontrole 2. dana i propolisom tretiranih stanica, utvrđena je statistički značajna razlika u cijeljenju rana ($p<0,0032$). Tijekom vremenskog perioda od 3 dana, statistički značajno je povećanje rasta tretiranih stanica propolisom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Najbolje vrijednosti cijeljenja imale su stanice tretirane s 1,5% i 1% otopinom propolisa.

Imunomodulatornim djelovanjem propolis povećava oslobađanje vazoaktivnih posrednika poput metabolita arahidonske kiseline. ELISA metodom izolacije interleukina 6 dokazan je statistički značajan porast IL-6 ($p< 0.0086$) između jažica tretiranih 1.5%, 1% i 0,5% otopinama propolisa te kontrolama A, B i C tijekom 3 dana. Propolis povećava oslobađanje citokina IL-6 i faktore rasta poput PDGF i FGF. Time je dokazan imunomodulatorni učinak propolisa u poticanju bržeg cijeljenja rana.

Ključne riječi: Propolis, bezalkoholni ekstrakt, cijeljenje rana

9. SUMMARY

EFFECT OF PROPOLIS EXTRACTS ON WOUND HEALING MARKERS IN HUMAN IMMORTALIZED KERATINOCYTE CELL CULTURE

Propolis has immunomodulatory, antimicrobial, antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects, which promotes faster wound healing. Important compounds in propolis are flavonoids, phenylpropenoids and phenolic acids such as coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) has an immunosuppressive effect by inhibiting bacterial growth, preventing cell division. The antioxidant action of propolis is stimulated by the high concentration of polyphenols and flavonoids. Non-alcoholic propolis extract shows antimicrobial effect on gram positive bacteria and gram negative bacteria. Propolis shows an antifungal effect against fungi. MTT cytotoxicity test demonstrated the safety of propolis against cells. Considering the results of the scratch test, 1.5%, 1%, and 0.5% concentrated propolis solutions achieved statistically significantly faster wound healing compared to wells treated with controls A, B, and C. Using the t test between control day 2 and propolis treated cells, a statistically significant difference in wound healing was found ($p < 0.0032$). Over a time period of 3 days, there was a statistically significant increase in the growth of propolis-treated cells compared to the control group. Cells treated with 1.5% and 1% propolis solution had the best healing values.

By its immunomodulatory action, propolis increases the release of vasoactive mediators such as arachidonic acid metabolites. ELISA isolation of interleukin 6 showed a statistically significant increase in IL-6 ($p < 0.0086$) between wells treated with 1.5%, 1% and 0.5% propolis solutions and controls A, B and C for 3 days. Propolis increases the release of the cytokine IL-6 and growth factors such as PDGF and FGF. This has proven the immunomodulatory effect of propolis in promoting faster wound healing.

Keywords: propolis, non-alcoholic extract, wound healing

10. ŽIVOTOPIS

Zovem se Sunčica Sertić. Rođena sam 23. 7. 1996. godine u Zagrebu. 2015. godine završavam gimnaziju Daruvar te iste godine upisujem Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu. Od 2018. godine suradnica sam na EU projektu „SoftVets“ u suradnji s dr. sc. Ladom Radin u organizaciji brojnih radionica poput „ Student challenge“ kojom smo napravili suradnju s Zagrebačkom školom ekonomije i menagementa. Tom suradnjom uspostavili smo daljnje projekte s izv. prof. Tinom Lee Odynski Zec raznim radionicama „ Entrepreneural Mindset“ i „ Design thinking“. Volontirala sam na brojnim kongresima poput EAEV, Veterinarska znanost i struka, 100 godišnjica fakulteta te predstavljala fakultet u Zoološkom vrtu na Danu risa. Uz to, prisustvovala sam neuroanatomskim vježbama Medicinskog fakulteta te vježbama projekta Neurići, a u rujnu 2019. godine na Kongresu farmakologije. Isto tako, volontirala sam u tvornici stočne hrane Prirast d.o.o., u kojoj sam stekla mnoga znanja. U uredničkom odboru znanstveno-stručnog časopisa Veterinar sam od 2018. godine, dok 2020. godine postajem zamjenica glavne urednice.

Šestu godinu studija provela sam kao diplomantica Instituta Ruđer Bošković na kojemu sam uz diplomski rad, radila još 4 znanstvena istraživanja pretkliničkog ispitivanja lijeka. Svakodnevnim radom u Laboratoriju za naprednu genomiku, zavoda Molekularne medicine usvojila sam brojne metode molekularne dijagnostike. Provodila sam pretkliničko ispitivanje antimikrobne učinkovitosti na bakterijskim kulturama i kulturama gljivica, dok sam na staničnim kulturama ispitivala cijeljenje rana. U istraživanjima sam koristila stanične kulture HaCat, HEK i SH-SY5. HaCaT staničnu kulturu koristila sam za ispitivanje cijeljenja rana, dok SH-SY5 za ispitivanje neurotoksičnosti.