
Sonja Čučulanović

Antioksidantna svojstva alkoholnih rastvora propolisa

Slobodni radikali reaguju sa mnogim biomolekulima dovodeći do njihovih strukturnih oštećenja i smanjenja funkcionalnih svojstava. Oštećenjem membrana ćelija u procesu lipidne peroksidacije narušava se njihov integritet i funkcija. Zbog toga su brojna istraživanja okrenuta pronalaženju supstanci iz prirode sa antioksidantnim svojstvima. Propolis je pčelinja smola kompleksnog sastava sa jedinjenjima koja imaju antioksidantne osobine. Cilj rada bio je ispitivanje antioksidantnih svojstava 10%, 15% i 20% alkoholnog rastvora propolisa. Kao model sistem in vitro ispitivanja antioksidantnog statusa korišćena je teleća jetra. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da propolis u svim korišćenim koncentracijama pokazuje inhibitorno dejstvo na proces lipidne peroksidacije. Najviši antioksidantni potencijal pokazale su 15% propolis kapi, a najniži 20%.

Uvod

Slobodni radikali mogu biti kao atom, grupa atoma ili molekul sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljnoj orbitali. Mogu se posmatrati kao čestice sa "polovičnim" vezama što je i uzrok njihove velike reaktivnosti (Koraćević 1996). Lako reaguju sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama, dovodeći do njihovih oksidativnih modifikacija. Svoj štetni efekat na ćelije slobodni radikali, između ostalog, ostvaruju inicirajući proces lipidne peroksidacije koji za posledicu ima ireverzibilna oštećenja strukture i funkcije same ćelije. Taj proces se odvija autokatalitički preko niza lipidnih radikala, a kao krajnji degradacioni produkt peroksidacije lipidnih membrana nastaje malondialdehid (u daljem tekstu MDA) (Martin, Mayes 1992). Promene u ćelijskoj membrani dovode do povećanja njene permeabilnosti što ugrožava integritet ćelije. Tokom evolucije došlo je do razvoja raznih mehanizama antioksidativne zaštite organizama. Primarni antioksidativni sistem zaštite organizma čine enzimi superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, katalaza i dr. Drugu liniju odbrane čine endogeni antioksidansi, prvenstveno vitamin C i vitamin E. U ovu grupu spadaju još i flavonoidi, polifenoli, karotenoidi i dr. (Koraćević 1996).

Sonja Čučulanović (1983), Smederevo, Miloša Velikog 29/46, učenica 4. razreda Gimnazije Smederevo

Propolis, ili pčelinja smola, je biološka materija složenog hemijskog sastava. U propolisu se nalaze mnogi vitamini, minerali, organske kiseline i flavonoidi, za koje je utvrđeno da u izvesnoj meri mogu da spreče oksidacione procese tj. da imaju antioksidantni potencijal. Zbog toga se smatra da i propolis ima antioksidantna svojstva (Bankova 200). U komercijalnoj upotrebi se nalaze različiti preparati sa propolisom, a najširu primenu imaju kapi propolisa koje predstavljaju razblaženja propolisa u alkoholu. Postoji spektar razblaženja, a najčešće se koriste 10%, 15% i 20% propolis kapi.

Cilj rada je ispitivanje antioksidantnih svojstava različitih koncentracija alkoholnih rastvora propolisa.

Materijal i metode

Antioksidantna svojstva propolisa su ispitivana u *in vitro* sistemu, a kao model korišćena je teleća jetra. Procenat inhibicije lipidne peroksidacije izračunat je na osnovu dobijenih koncentracija MDA u homogenatu jetre. Za određivanje antioksidantnih svojstava neke supstance potrebno je u homogenatu jetre, u koji se dodaje supstanca, stimulisati proces lipidne peroksidacije dodavanjem prooksidacionih sredstava. Na ovaj način dobija se *stimulisana količina lipidnih peroksida*. Ako ispitivana supstanca ima antioksidantna svojstva, ona će inhibirati proces lipidne peroksidacije, odnosno koncentracija MDA će biti manja u odnosu na uzorak gde nije bila dodata ta supstanca. S obzirom da se u jetri već nalazi izvesna količina MDA neophodno je prvo odrediti tu količinu MDA, koja predstavlja *inicijalnu ili nativnu lipidnu peroksidaciju*. Time se anulira uticaj već prisutnog MDA. Inicijalne i stimulisane količine lipidnih peroksida (u daljem tekstu LPO) određuju se za svaki homogenat. Razlika stimulisane i inicijalne količine LPO predstavlja proizvod lipidne peroksidacije tj. *indukovanu lipidnu peroksidaciju*. Koncentracija MDA se određuje koristeći njegovo svojstvo da na povišenoj temperaturi sa tiobarbiturnom kiselinom (u daljem tekstu TBA reagens) gradi TBA-MDA konjugat crvene boje sa maksimumom apsorpcije na 540 nm (Simić, Marković 2002).

Postojale su četiri grupe i za svaku od njih je spremljen homogenat teleće jetre. Prva grupa je bila kontrolna i nije joj dodavan rastvor propolisa, a u ostale tri su redom dodavane 10%, 15% i 20% propolis kapi odmah nakon pripreme homogenata. Rađeno je po šest ponavljanja za svaku grupu.

Postupak spremanja homogenata. Za svaku grupu odmeri se po 0.2 grama sveže jetre i homogenizuje u avanu sa 10 volumena rastvora kalijum hlorida ($c = 0.16 \text{ mol/L}$). Potom se homogenat razblaži 4 puta sa istim rastvorom kalijum hlorida. Homogenat svake grupe se prenese u 4 epruvete. U dvema epruvetama se odredi inicijalna, a u drugim dvema stimulisana količina LPO. Po dve epruvete za svako određivanje koriste se radi

dobijanja srednje vrednosti. U svaku epruvetu, u kojoj se određuje antioksidantni status, dodaje se po 0.2 mL propolis kapi različitih koncentracija (10%, 15%, 20%).

Inicijalna količina lipidnih peroksida određuje se mešanjem 0.2 mL butiliranog hidroksi toluena (BHT), koncentracije 10 mmol/L, sa 2 mL homogenata i 0.2 mL propolisa. Slepa proba je smeša 2 mL kalijum-hlorida i 0.2 mL BHT. Butilirani hidroksi toluen je antioksidans i dodaje se homogenatu da bi sprečio propagaciju lipidne peroksidacije. Sprečavanjem peroksidacije moguće je odrediti uticaj već prisutne količine MDA u jetri na stimulisanu peroksidaciju.

Stimulisana peroksidacija se određuje kada se pomeša 0.1 mL Morove soli ($c = 0.04$ mmol/L), 0.1 mL askorbinske kiseline, 2 mL homogenata jetre i 0.2 mL propolisa. Morova so i askorbinska kiselina predstavljaju prooksidanse i homogenatu se dodaju za stimulisanje lipidne peroksidacije. Slepa proba je i ovde smeša 2 mL kalijum-hlorida i 0.2 mL BHT.

Sve epruvete, za inicijalnu i stimulisanu lipidnu peroksidaciju, se inkubiraju 10 min na 37°C, a potom se u svaku dodaje po 1ml 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA) i 1 mL TBA reagensa ($c = 55$ mmol/L, rastvoreno u 0.1 M natrijum hidroksidu). Zatim se sve inkubira 10 minuta na 100 stepeni, a onda centrifugira 10 minuta na 3000 obrtaja. U supernatantu se nalazi TBA-MDA konjugat čija se apsorbancija meri na 540 nm.

Računanje se vrši na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta ϵ za TBA-MDA konjugat. Inicijalni sadržaj lipidnih peroksida K_{lpo} računa se preko jednačine:

$$K_{lpo} = \frac{A_k}{\epsilon} \times \frac{V_t}{V_p} \times R \times 10$$

Sadržaj lipidnih peroksida nakon stimulisane lipidne peroksidacije S_{lpo} dobija se iz formule:

$$S_{lpo} = \frac{A_p}{\epsilon} \times \frac{V_t}{V_p} \times R \times 10$$

A_k – apsorbancija za inicijalnu LPO

A_p – apsorbancija nakon stimulisane LPO

V_t – zapremina uzorka

V_p – zapremina probe

R – razblaženje propolisa

10 – faktor za preračunavanje na gram tkiva (10% homogenat)

ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent za TBA-MDA konjugat (0.156 nmol/mLcm)

Indukovana lipidna peroksidacija I_{lpo} izračunava se iz razlike u saržaju lipidnih peroksida pre i posle stimulacije pod uticajem prooksidanasa. Ona odgovara količini LPO koju produkuje 1 g tkiva pod opisanim uslovima:

$$I_{lpo} = S_{lpo} - K_{lpo}$$

Procenat inhibicije lipidne peroksidacije se izračunava iz formule:

$$\text{procenat inhibicije} = 100 - \frac{C_{MDA_{grupe}}}{C_{MDA_{kontrolne}}} \times 100$$

pri čemu je $C_{MDA_{grupe}}$ srednja vrednost koncentracije malondialdehida grupe kojoj su dodavane 10%, 15% ili 20% propolis kapi, a $C_{MDA_{kontrolne}}$ je srednja vrednost koncentracije malondialdehida kontrolne grupe.

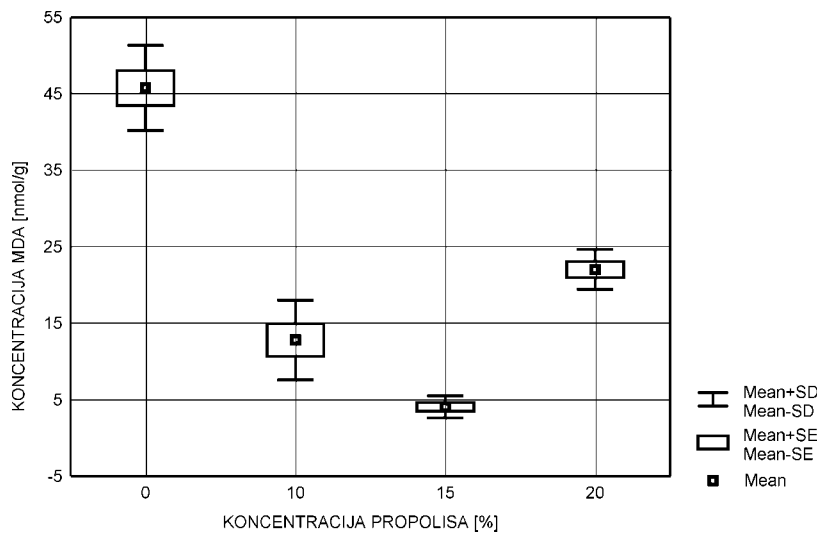
Rezultati i diskusija

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su sve korišćene koncentracije propolisa pokazale visok inhibicioni efekat na proces lipidne peroksidacije. Rezultati dobijeni u radu predstavljeni su u tabeli 1 i na grafiku (slika 1).

Tabela 1. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) po grupama

Proba	Kontrola	Propolis		
		10%	15%	20%
1.	50.35	10.15	3.38	20.59
2.	48.87	23.27	4.23	24.96
3.	44.70	12.41	6.06	19.03
4.	37.70	10.72	5.36	19.88
5.	41.06	10.85	2.39	25.10
6.	51.83	9.45	2.96	22.56
Srednja vrednost	45.75	12.81	4.06	22.02
Procenat inhibicije	–	72	91.12	51.87

Najviši antioksidacioni potencijal pokazalo je 15% razblaženje propolisa u kojem se nalazi čak 91% manje MDA u odnosu na kontrolnu grupu. U 10% razblaženju propolisa nalazi se 72% manje MDA nego u kontrolnoj grupi. Nasuprot očekivanju da će 20% propolis kapi pokazati najviši inhibicioni efekat dobijen je rezultat koji može da ukazuje na to da propo-



Slika 1.
Zavisnost koncentracije MDA od koncentracije propolisa

Figure 1.
MDA concentration depending on concentration of propolis

lis pokazuje antioksidantna svojstva do određene granice. Povećanjem koncentracije propolisa u rastvoru njegov antioksidacioni potencijal opada. U ovoj grupi procenat inhibitornog dejstva iznosi 52% u odnosu na kontrolnu grupu. Iako je to visok procenat inhibicije lipidne peroksidacije, on je ipak manji u poređenju sa grupom kojoj su dodavane 15% propolis kapi. Novo istraživanje antioksidantnih svojstava propolis kapi u kojem bi bile korišćene veće koncentracije propolisa, pokazale bi da li propolis primenjen u većim koncentracijama može imati i prooksidantna svojstva.

Zaključak

Ispitivani alkoholni rastvori propolisa, u posmatranom *in vitro* sistemu, pokazali su visok procenat inhibicije lipidne peroksidacije, što ukazuje da propolis poseduje antioksidantna svojstva. Na osnovu dobijenih koncentracija malondialdehida u grupi kojoj su dodavane 20% propolis kapi, a koji ukazuju na povećanje koncentracije MDA, u odnosu na grupu gde su dodavane 15% propolis kapi, može se pretpostaviti da propolis kapi u povećanim koncentracijama mogu imati i prooksidacioni efekat. Daljim istraživanjima moglo bi se utvrditi do koje granice raste, odnosno odakle opada, antioksidantni potencijal propolisa.

Zahvalnost. Luki Mihajloviću na njegovoj nesebičnoj pomoći u izradi ovog rada.

Literatura

Bankova V. 2000. Determining Quality in Propolis Samples. *Journal of the American Apitherapy Society*, 7.

Koraćević D., Bjelaković G. 1996. *Biohemija*. Beograd: Savremena administracija

Martin D.W.Yr., Mayes P.A. 1992. *Harperov pregled biohemije*. Beograd: Savremena administracija

Simić T., Marković I. 2002. *Priručnik za vežbe iz biohemije*. Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu

Sonja Čučulanović

Antioxidant Features of Propolis

Free radicals areact with many biomoleculs causing the damage of their structure and decreasing their functions. In organisms free radicals start the lipid peroxidation process on cell membrane. This process continues autocatalitically and causes reversible damages to both functions and structures of cell membrane. One of the final products of membrane degradation is malon-dialdehyde (MDA). In view of the fact that this process causes cellular damage, many researches have been made to find natural antioxidants. Propolis is bee pitch containing very complex chemical compounds with antioxidant features, so it is presumed that propolis itself has the same feature. In this work the aim was to determine whether propolis has antioxidant feature and which concentration of propolis alcohol solutions (10%, 15%, 20%) has highest lipid peroxidation inhibition. This propolis solutions are commercially called propolis drops.

Calf liver is used as *in vitro* model to determine the rate of peroxidation of lipids. The characteristic of MDA to form the red colored substance with thiobarbituric acid (TBA) at higher temperature is used. The results of the test are shown in table and Figure 1. They proved that all used concentrations of propolis have inhibitory effects on the process of lipid peroxidation. It was deduced that 15% alcohol solution of propolis has the highest antioxidant power – it showed 91% inhibition of lipid peroxidation. The 20% propolis solution had lowest percent of lipid peroxidation, compared to the control group. In this group the percentage of lipid peroxidation was 52%. The group with added 10% propolis drops showed 72% of peroxidation inhibition. All this can point to limited antioxidant features of propolis.

