

(Pagal priemonę „Moksliniai tyrimai bitininkystės sektoriuje“ atlikto tyrimo ataskaitos forma)

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

(nurodomas tyrimą atlikusios institucijos pavadinimas)

<b>I. PAGRINDINIAI DUOMENYS APIE TYRIMĄ</b>					
Pavadinimas <i>(Nurodomas tyrimo pavadinimas, ne daugiau kaip 100 spaudos ženklų)</i> <b>Propolio biologiškai aktyvių medžiagų, esančių hidrofiliuose ekstraktuose, poveikio fibroblastų ląstelėms tyrimas</b>					
Kryptis <i>(Nurodoma, kuriai kryptčiai pagal 2023–2027 m. strateginio plano sektorinės intervencinės priemonės priskiriamas tyrimas)</i> Moksliniai tyrimai bitininkystės sektoriuje					
<b>II. TYRIMO VYKDYTOJAI</b> <i>(Aprašomi asmenys, kurie vykdė tyrimą, surašomi nurodyti duomenys)</i>					
Eil. Nr.	Pareigybė atliekant tyrimą <i>(pasirenkama)</i>	Mokslo laipsnis	Vardas, pavardė	Telefonas, el. paštas	Darbovietės pavadinimas, pareigos
Tyrimo vadovas					
1.	Vyriausioji mokslo darbuotoja	dr	Daiva Majienė	061523993 Daiva.majiene@lsmuni.lt	LSMU Vaistų technologijos ir soc farmacijos k-dra, profesorė
Kiti tyrimo vykdytojai					
2.	Vyriausioji mokslo darbuotoja	dr	Kristina Ramanauskienė	062064281 Kristina.ramanauskiene@lsmu.lt	LSMU Biofarmacijos k-dra, profesorė
3.	Mokslo darbuotoja	dr	Inga Matulytė	062996910 inga.matulyte@lsmu.lt	LSMU Vaistų technologijos ir soc farmacijos k-dra, lektorė
4.	Jaunesnioji mokslo darbuotoja	dr	Jurga Andrėja Kazlauskaitė	0 69444084 jurga.andreja.kazlauskaite@lsmu.lt	LSMU Vaistų technologijos ir soc farmacijos k-dra, asistentė

## III. SANTRUMPOS IR SUTARTINIAI ŽENKLAI

Santrumpa ar sutartinis ženklas	Paaškinimas
VPT	Vandeninis propolio tirpalas
EPT	Etanolinis propolio tirpalas
Pg-VPT	Vandeninis propolio tirpalas su 10 % etanolio ir 10 % PEG priedais
EuPT	Eutektinis propolio tirpalas
PEG 400	Polietilenglikolis 400
HDF	Žmogaus dermos ląstelių linija
PC	Bendras fenolinių junginių kiekis

## IV. PAGRINDINIŲ REZULTATŲ SANTRAUKA

*Glaustai pateikiami pagrindiniai tyrimo rezultatai lietuvių kalba (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).*

Siekiant įvertinti ir palyginti propolio ekstrakcijos metu naudoto tirpiklio įtaką fenolinių junginių išsiskyrimo intensyvumui iš žaliavos buvo pagaminti 4 propolio skystieji ekstraktai naudojant skirtingus tirpiklius: (1) injekcinis vanduo; (2) kompleksinis tirpiklis, sudarytas iš 80 % injekcinio vandens, 10 % etanolio ir 10 % PEG, (3) injekcinio vandens, citrinos rūgšties ir cholino chlorido eutektinis mišinys santykiu 2:1:2, (4) etanolinis. Pagaminti ekstraktai buvo malonaus kvapo, nuo šviesiai rudos ir tamsiai rudos spalvos. Daugiausiai veikliųjų junginių buvo nustatyta propolio tirpale, pagamintame su eutektiniu mišiniu. Visi pagaminti tirpalai (išskyrus VPT) buvo stabilūs. Siekiant įvertinti tirpalų biologinį poveikį, pirmiausiai buvo įvertintas tirpiklių skirtingų kiekių poveikis ląstelių HDF kultūrai. Tyrimų rezultatai parodė, jog eutektinis mišinys bei etanolis, panaudoti 1,5 – 2% ir didesnėmis koncentracijomis, mažina ląstelių gyvybingumą, todėl tolimesniuose tyrimuose ekstraktai buvo pridėti ne pagal tūrį, o pagal bendrą fenolinių junginių kiekį.

Siekiant įvertinti tirpalų poveikį oksidacinio streso sąlygomis, pirmiausiai buvo parinkta ląstelės inkubuoti 24 h su 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ko pasekoje ląstelių gyvybingumas sumažėja 68-70 %, nes inicijuojama ląstelių žūtis apoptozės bei nekrozės būdu. Eksperimentinius šulinėlius, kuriuose sukurtos oksidacinio streso sąlygos, praturtinus skirtingais propolio tirpalais, nustatyta, jog mažiausia naudota veikliųjų junginių koncentracija 10 μM PC ląstelių gyvybingumą padidino 8-17 %, 30 - 40 μM PC ląstelių gyvybingumą atstatė iki 80 %, naudojant didesnes propolio veikliųjų junginių koncentracijas nepavyko pasiekti dar geresnio ląstelių metabolinio aktyvumo ir gyvybingumo.

Šių tyrimų rezultatai rodo, jog biologinis poveikis priklauso nuo veikliųjų junginių koncentracijos, o ne nuo ekstrakto tipo, jei pridedama ne didesni, nei 1,5-2 % tirpalų.

## V. TURINYS

*IVADAS (glaustai pristatomas tyrimo tikslas, objektas ir nurodomi uždaviniai, kuriuos buvo siekiama išspręsti; ne daugiau kaip 2 000 spaudos ženklų).*

Šiame tyrime buvo nuspręsta sutelkti dėmesį į propolį – vieną iš bičių produktų, kurį pasižymi plačiu biologiniu poveikiu. Bitės renka propolį iš gyvų augalų, esančių kelių kilometrų atstumu aplink bičių buvimo vietą o tai lemia turtingą, bet nepastovų veikliųjų junginių spektrą. Šiuo metu mokslininkai analizuoja ryšį tarp propolio biologinio aktyvumo ir individualios propolio cheminės sudėties. Shigenori Kumazawa ir kt. nustatė, kad etanoliniai propolio ekstraktai pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu, koreliuojančiu su polifenolių ir flavonoidų kiekiu (Szliszka, E., & Krol, W., 2013). Daug dėmesio skiriama propolio moksliniais tyrimais pagrįstu pritaikymu kosmetikos,

farmacijos, veterinarijos ir medicinos produktuose dėl turimų priešuždegiminių, antioksidacinių bei antibakterinių savybių. Propolio žaliavos apdorojimui reikalinga parinkti specialias technologijas. Plačiausiai taikoma propolio etanoliniai ekstraktai, tačiau jie ne visais atvejais tinkami ypač puskiečių preparatų gamybai. Šiuo metu vis didesnio mokslininkų dėmesio sulaukia hidrofiliniai ekstraktai, kaip alternatyva etanoliniams ekstraktams. Tačiau veikliųjų junginių išskyrimas iš propolio žaliavos yra didelis technologinis išūkis dėl propolio hidrofobinės prigimties. Vienas iš būdų yra atlikti ekstrakciją taikant ultragarso (Trusheva, B ir kt., 2007). Aktualu įvertinti, kaip klasikinės maceracijos ir ultragarso kombinacija gali būti efektyviai pritaikoma propolio veikliųjų junginių ekstrakcijai.

Šio **darbo tikslas** buvo ištirti hidrofilinių propolio tirpalų poveikį fibroblastų ląstelėms patologijos sąlygose

#### **Uždaviniai:**

- pagaminti hidrofilinius sterilius propolio tirpalus bei pritaikyti juos tyrimams su odos fibroblastų ląstelėmis;
- atlikti tirpalų kiekybinę analizę;
- Tirti pagamintų propolio tirpalų poveikį žmogaus dermos ląstelių metaboliniam aktyvumui;
- Tirti hidrofilinių propolio tirpalų poveikį ląstelių gyvybingumui oksidacinio streso sąlygomis;

**Tyrimo objektas:** propolio vandeniniai sterilūs tirpalai; propolio tirpalai, pagaminti su hidrofilinių tirpiklių kompleksu; propolio tirpalai, pagaminti su eutektiniu mišiniu; žmogaus dermos ląstelės.

**DĖSTOMOJI ATASKAITOS DALIS** (išdėstoma tyrimų metodika, įvertinamas jos patikimumas ir tikslumas, išvardijami pagal paraiškoje pateiktą kalendorinį darbų planą numatyti atlikti darbai, nurodoma, kurie darbai atlikti, kurie ne; dėl neatliktų darbų paaiškinama, kodėl jie neatlikti. Pateikiami svarbiausi tyrimo rezultatai (lyginant su kitų tyrėjų rezultatais), nurodoma jų reikšmė. Jei gauti rezultatai išdėstyti ataskaitos prieduose pateikiamų mokslinių publikacijų kopijose, priimtų ar parengtų spaudai straipsnių ir kt. kopijose, ataskaitoje jie tik cituojami, t. y. pažymimi nuorodose ar išnašose (ataskaitos apimtis neribojama). Ataskaitoje turi būti pateikta tik ta informacija, kurią galima skelbti viešai).

#### **Metodai**

Visi tyrimo eigoje naudoti metodai yra tikslūs ir patikimi.

##### 1. Propolio ekstraktų gamyba

Eksperimentinių tyrimų metu buvo pagaminti 20 proc. propolio skystieji ekstraktai modifikuotu maceracijos metodu. Propolio ekstrakcijai naudojamas: etanolinis tirpalas, injekcinio vandens, citrinos rūgšties ir cholino chlorido eutektinis mišinys santykiu 2:1:2, ir kompleksinis vandeninis tirpiklis - 10 proc. polietilenglikolio vandeninis tirpalas su 10 proc. etanolio tirpalo priedu. Pagamintų ekstraktų sudėtys pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Skystųjų propolio ekstraktų sudėtys.

Partijos Nr.	Ekstraktai			
	E1 (EPT)	E2 (VPT)	E3 (EuPT)	E4 (Pg-VPT)
Komponentai, g				
<i>Propolio žaliava</i>	20	20	20	20

<b><i>Etanolis 70 proc. (V/V)</i></b>	-	10	-	Iki 100
<b><i>Polietilenglikolis 400 (PEG 400)</i></b>	-	10	-	-
<b>Eutektinis mišinys: injekcinis vanduo, citrinų rūgštis, cholino chloridas</b>	-	-	Iki 100	-
<b>Injekcinis vanduo</b>	Iki 100	Iki 100	-	-

Pasveriamas reikiamas kiekis susmulkintos propolio žaliavos ir užpilama ekstrahentu, maišoma, indas sandariai uždaromas ir paliekama stovėti 3 paras, kambario temperatūroje ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Po 2 parų ekstrahuojami ultragarso vonelėje 15 min. Po šio ekstrakcijos proceso tęsiamas maceravimo procesas, laikant 1 parą kambario temperatūroje ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Po ekstrahavimo proceso ekstraktai atskiriami nuo žaliavos. Surinktas ekstraktas laikomas šaldytuve vieną parą nusodinti balastinėms medžiagoms. Ekstraktas filtruojamas per bepelenį filtrą [Zhang, J. ir kt., 2015, Stanciauskaite M. ir kt., 2021].

## 2. Ekstraktų sterilizavimas ir laikymas

Ekstraktai buvo sterilizuojami Sterilios filtracijos metodu kad būtų išsaugoti tirpaluose esantys lakūs ir termolabilūs junginiai, kuriais turtinga propolio žaliava.

Su skirtingais tirpikliais pagaminti tirpalai/ekstraktai filtruojamas per sterilią 0,22  $\mu\text{m}$  storio membraną tiesiai į steriliais pakuotes po 5 ml. Pripildytos talpyklės uždaromos steriliais uždoriais ir laikomos vėsioje vietoje iki tyrimo.

## 3. Bendras fenolinių junginių kiekio nustatymas propolio ekstraktuose

Ekstraktų bendro fenolinių junginių kiekio nustatymas atliekamas pagal Dominguez-López, I., Pérez, M., & Lamuela-Raventós, R. M (2024) metodiką, su tam tikromis modifikacijomis. 150  $\mu\text{l}$  mėginio (kontroliniam mėginiui pilamas tirpiklis naudotas ekstraktų gamyboje) 2ml mėgintuvėlyje sumaišoma su 750  $\mu\text{l}$  2 M Folin-Ciocalteu reagentu. Praėjus 3 min. pilama 600  $\mu\text{l}$  75 g/L koncentracijos  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tirpalo, reakcijos mišiniai inkubuojami 2 val tamsoje. Mėginių absorbcija matuojama spektrofotometru, esant 760 nm bangos ilgiui [Dominguez-López ir kt., 2024].

## 4. HDF ląstelių linijos kultivavimas

Tyrimo buvo naudojamas žmogaus odos (dermos) ląstelių modelis. Ląstelės buvo auginamos flakonuose su mitybine terpe, sudaryta iš: DMEM ląstelių mitybinės terpės su 10 % jaučio serumo albumino ir 1% antibiotikų priedo. Kultūros buvo kultivuojamos inkubatoriuje esant tokioms sąlygoms:  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūra, 5 %  $\text{CO}_2$  bei prisotinta drėgmės.

Ląstelių persėjimas: nupilama mitybinė terpė iš flakono, praplaunama fosfatinu druskos tirpalu, užpilama 400  $\mu\text{l}$  tripsino/EDTA (0,25 %) tirpalo ir palaukiama, kol tirpalas išardys tarpląstelines ląstelių jungtis ir jos atkibs nuo flakono vidinių sienelių. Tripsinas neutralizuojamas mitybine terpe ir ląstelės perkeliama į centrifugavimo mėgintuvėlį, kuris centrifuguojamas centrifugoje 5 min.,  $22^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, esant 1500 apsisukimų per min. greičiui. Supernatantas, esantis mėgintuvėlyje, yra nupilamas. Ant mėgintuvėlyje likusių ląstelių yra užpilamas 1 ml mitybinės

terpės, tirpalas yra homogenizuojamas. 100-200 µl homogenato yra perkeliama į flakoną su nauja mitybine terpe ir kultivavimas vykdomas toliau.

Likus 24 val. iki ląstelių poveikimo skirtingais ekstraktų tirpalais, jos buvo perkeltos į eksperimentinius šulinėlius.

#### 5. HDF ląstelių metabolinio aktyvumo tyrimas

Siekiant nustatyti ląstelių metabolinį aktyvumą, po 24h inkubacijos su ląstelėmis bei tiriamaisiais mėginiais yra pašalinama terpė, ląstelės du kartus praplaunamos buferiniu tirpalu. Po praplovimų užpilama 180 µl HBSS ir 20 µl MTT dažų (5 mg/ml) mišinio. Inkubuojame 2h. Po šios inkubacijos yra pašalinama terpė. Susidarę formzono kristalai tirpinami DMSO ir išmatuojama susidariusio tirpalo absorbcija esant 550 nm bangos ilgiui, su 620 nm bangos ilgio korekcija.

#### 6. HDF ląstelių gyvybingumo tyrimas oksidacinio streso sąlygomis

24 h iki tyrimo eksperimentiniai šulinėliai buvo papildyti 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ir tiriamaisiais ekstraktais. Praėjus numatytams inkubacijos laikui, ląstelių branduoliai buvo nudažyti propidžio jodidu (PI, 3 µg/ml) ir Hoechst 33342 (6 µg/ml). Ląstelės su dažikliais buvo inkubuojamos 15 min. 37 °C temperatūroje, kol dažikliai pateks į ląsteles. Nudažytos ląstelės buvo vizualiai tiriamos fluorescenciniu mikroskopu OLYMPUS IX71SIF-3. Tik Hoechst 33342 dažikliu nusidažę branduoliai, kurie pasižymėjo mėlyna fluorescencija, buvo laikomi gyvybingais, o Hoechst 33342 ir PI nusidažę branduoliai, fluorescuojantis raudona spalva, buvo identifikuojami kaip nekrotizavę. Vaizdų analizė buvo atlikta naudojant ImageJ programinę įrangą.

#### 7. Statistinė duomenų analizė

Rezultatai pateikiami kaip 3-7 eksperimentų vidurkiai ± standartinis nuokrypis. Statistinė analizė atlikta taikant vienpusę dispersinę analizę (ANOVA) ir Dunnett'o post-testą naudojant programinės įrangos paketą SigmaPlot 13.0. Skirtumai tarp dviejų reikšmių yra laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

### Rezultatai

Visi tyrimai, numatyti darbo plane, yra pilnai įvykdyti, nors pagal kalendorinių grafiką jie pasistūmėjo, kadangi vėliau buvo gautas finansavimas:

Plane numatyti **Gegužės mėn darbai buvo atlikti birželio mėn**. Birželio mėn numatyti darbai buvo atlikti birželio ir dalis liepos mėn:

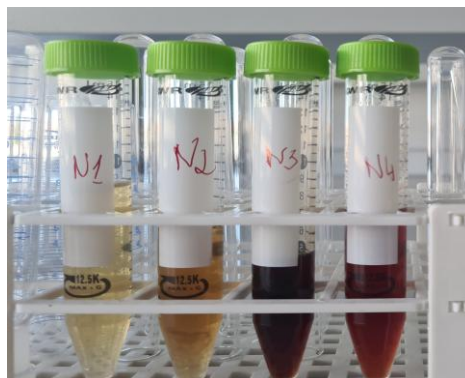
Buvo atlikti eksperimentai su literatūroje siūlomomis eutektinių mišinių kompozicijomis ir pasirinkta eutektinio mišinio sudėtis :

injekcinio vandens, citrinos rūgšties ir cholino chlorido eutektinis mišinys santykiu 2:1:2. Su tokiu tirpikliu pagamintos 6 ekstraktų (EuPT) serijos ir naudota tolimesniuose tyrimuose.

Buvo modifikuota hidrofiliinio tirpiklio su PEG sudėtis- pagaminta Pg-VPT, kurio sudėtyje yra 10 % PEG 400 ir 10 % etanolio. Ši modifikacija įvesta siekiant dar labiau padidinti lipofilinių veikliųjų junginių ekstrakciją iš propolio žaliavos. Pagamintos 6 šio tipo tirpalų serijos.

Taip pat buvo modifikuotas propolio veikliųjų junginių ekstrahavimo procesas – pasirinkta ekstrahavimo trukmė – 3 paros, apjungiant klasikinės maceracijos ir ultragarso metodus.

Tyrimų rezultatai parodė, jog tirpiklis daro įtaką ekstraktų kokybei. Pagaminti ekstraktai buvo malonaus kvapo, nuo šviesiai rudos ir tamsiai rudos spalvos. Išvaizdos nuotraukos pateiktos 1 paveiksle.



1 pav. Pagamintų propolio ekstraktų išvaizda.

Pagal spalvos intensyvumo stiprėjimą pagamintus ekstraktus galima išdėstyti šia seka: N1, N2, N4, N3. Ekstraktų išvaizdos skirtumai siejami su veikliųjų junginių kiekiu juose, kuris priklauso nuo pasirinkto tirpiklio žaliavos ekstrahavimui. Sekančiame tyrimų etape buvo įvertintas bendras fenolinių junginių kiekis ekstraktuose. Bendro fenolinių junginių kiekio tyrimų rezultatai pateikti 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Bendras fenolinių junginių kiekis išreikštas mg pagal kumaro rūgšties ekvivalentą/g (mg KRE/g) ± standartinis nuokrypis (SN) pagamintuose propolio ekstraktuose.

Partijos Nr.	E1	E 2	E3	E4
Bendras fenolinių junginių kiekis, mg/g	26.56 ± 0.36	41.12 ± 1.07	118.43 ± 2.36	89.49 ± 1.41

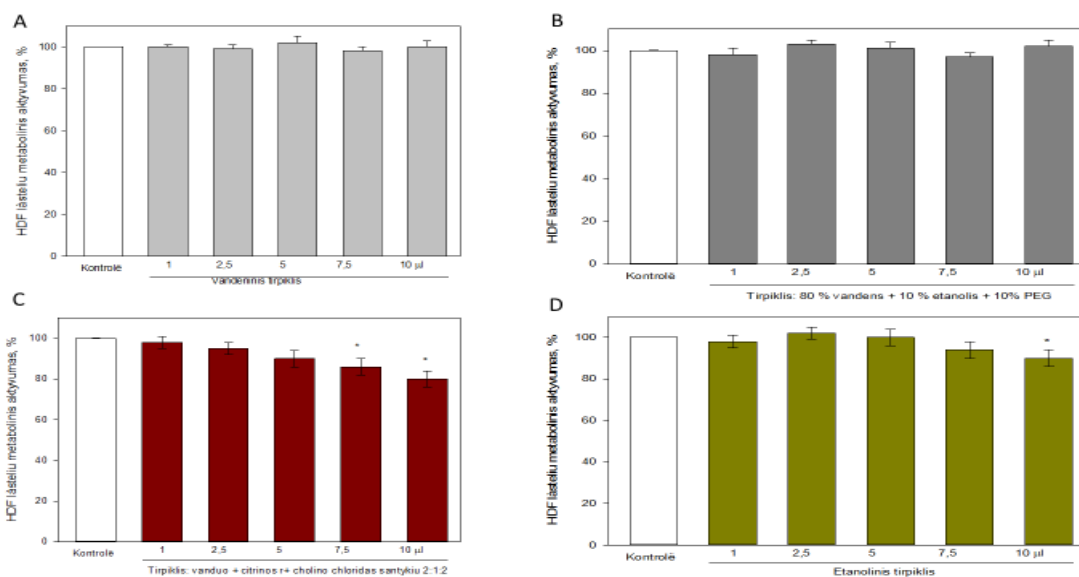
Paskelbti mokslinių tyrimų rezultatai demonstruoja, kad lietuviškame propolyje dominuoja parakumaro rūgštis (Stanciauskaite, M., ir kt., 2021), todėl bendram fenolinių junginių kiekiui nustatyti pasirinkta naudoti etaloniniu tirpalu para kumaro rūgštį, tyrimo rezultatai išreikšti kumaro rūgštis ekvivalentu mg/g. Didžiausias kiekis fenolinių junginių nustatytas ekstrakto E3, mažiausias ekstrakto E1. Tyrimų rezultatai patvirtino, jog eutektiniai tirpikliai yra efektyvūs fenolinių junginių išskyrimui ir gali būti naudojami propolio ekstraktų gamyboje, ypač siekiant jų pritaikymo odos preparatuose (Radoševič, K. ir kt., 2018). Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad vandeninis ekstraktas pasižymėjo mažiausiu fenolinių junginių kiekiu. Ir šie tyrimų rezultatai yra panašūs į ankstesniuose tyrimuose gautus rezultatus. Ekstraktas E2, kurio gamybai buvo pasirinkta naudoti vandeninį tirpalą su 10 proc. PEG ir 10 proc. etanolio priedu, pasižymėjo didesniu fenolinių junginių kiekiu lyginant su ekstraktu E1. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad kelių tirpiklių kombinacija gali pagerinti fenolinių junginių išskyrimą iš propolio žaliavos. Šie tyrimo rezultatai sutampa su kitų autorių skelbiamais duomenimis (Dugar, R. ir kt., 2016). Ekstrakte E4, kurio gamybai naudotas etanolis, nustatytas statistiškai reikšmingai ( $p < 0.05$ ) didesnis fenolinių junginių kiekis lyginant su ekstraktais E1 ir E2, bet mažesnis lyginant su ekstraktu E3. Didžiausias fenolinių junginių kiekis nustatytas ekstraktuose, pagamintuose su eutektiniu mišiniu ekstrahuojant kombinuotu maceracijos ir ultragarso metodu.

**Liepos mėn** buvo tęsiama ekstraktų gamyba ir sterilizavimas, o taip pat buvo atlikti tyrimai su ląstelių kultūromis:

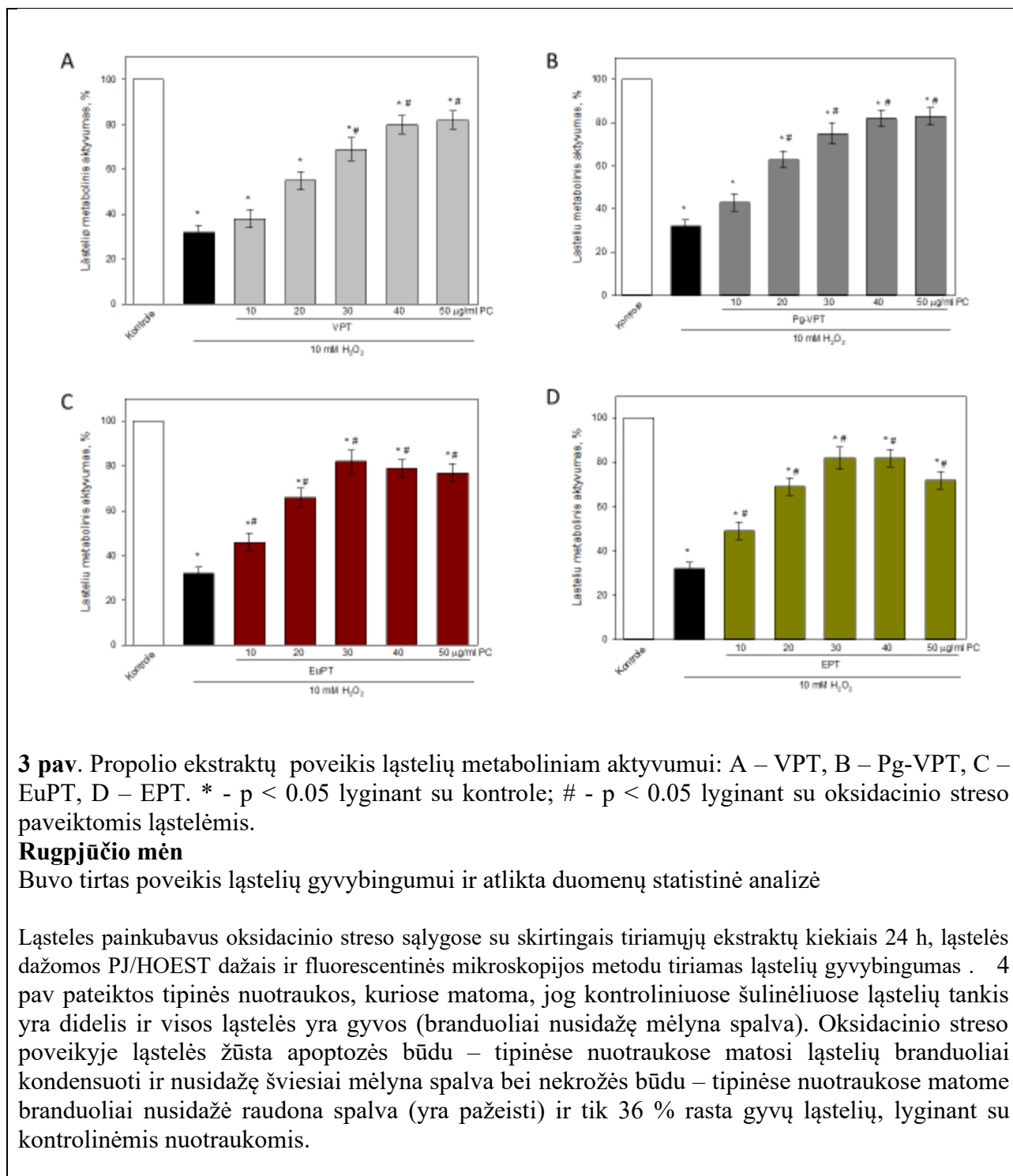
Pirmose eksperimentų serijose buvo siekta įvertinti įvairias tirpikliais paruoštų ekstraktų poveikį dermos ląstelių metaboliniam aktyvumui oksidacinio streso sąlygomis.

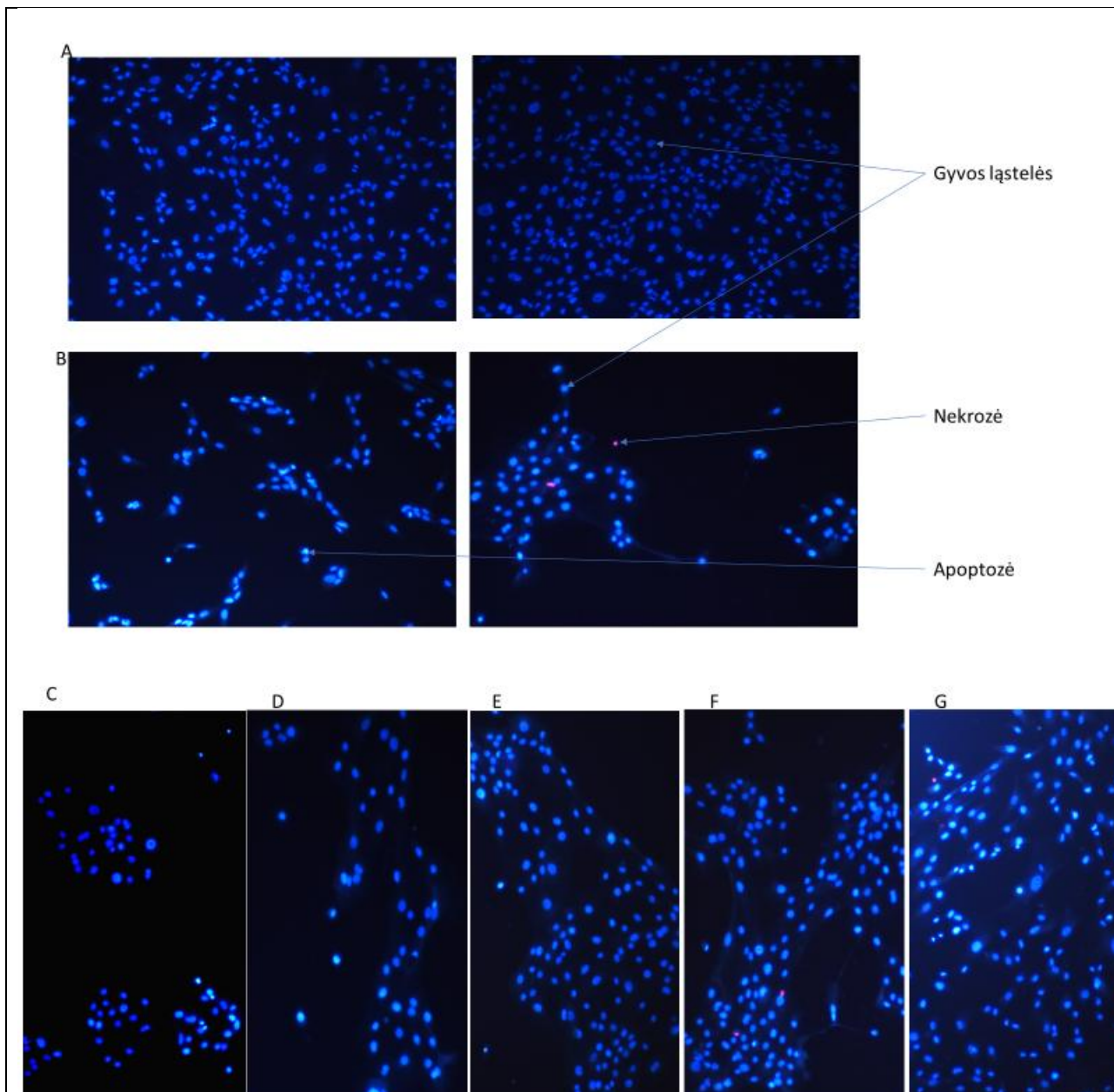
Pirmiausiai buvo ištirta tirpiklių, panaudotų propolio tirpalų gamybai, skirtingų kiekių poveikis HDF ląstelių kultūros metaboliniam aktyvumui. Tyrimų rezultatai pateikti 2 paveiksle. Tyrimo rezultatai parodė, jog ekstrahavimui naudojant injeckcinį vandenį, ar šio vandens ir 10 % PEG 400 bei 10 % etanolio mišinį, patys tirpikliai, pridėti kiekiais iki 2 % į eksperimentinius šulinėlius, ląstelių gyvybingumui poveikio neturėjo. Etanolinis tirpalas, pridėtas į šulinėlį 1,5 % ir 2 % ląstelių gyvybingumą sumažino 6 – 10 %, o eutektinio mišinio priedas 1-2 %, ląstelių gyvybingumą sumažino 14 – 20 % – šį poveikį galėjo lemti mitybinės terpės pH pokyčiai. Tolimesniems tyrimams apsispręsta ekstraktus pridėti ne pagal tūrį, o pagal bendrą fenolinių junginių kiekį.

Atliekant ląstelių metabolinio aktyvumo tyrimus, buvo sukurtos oksidacinio streso sąlygos pridedant į eksperimentinius mėgintuvėlius 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ir papildomai pridėta skirtingi kiekiai pagamintų ekstraktų. Taip paruošti mėginiai buvo inkubuoti 24 h, po to atlikti tyrimai. Tyrimų rezultatai pateikti 3 pav. Kontrolinių mėginių parodymai prilyginti 100 %, oksidacinio streso pasekoje ląstelių metabolinis aktyvumas sumažėjo iki 30 %. Jau 10 µg/ml PC statistiškai reikšmingai padidino ląstelių rodiklius 3 iš 4 ekstraktų tipų. 20-40 µg/ml PC pagerino ląstelių metabolinį aktyvumą iki 80 %. 50 µg/ml PC koncentracija buvo ribinė, nuo kurios EPT priedas jau pradėjo mažinti ląstelių rodiklius, o kitų ekstraktų priedas nepagerino ląstelių metabolinių rodiklių, palyginus su 40 µg/ml PC priedu.



**2 pav.** Tirpiklių, panaudotų propolio ekstraktų gamyboje, poveikis ląstelių metaboliniam aktyvumui: A – tirpiklis, panaudotas VPT gamybai, B – tirpiklis, panaudotas Pg-VPT gamybai, C – tirpiklis, panaudotas EuPT gamybai ir D – tirpiklis, panaudotas EPT gamybai





**4 pav.** Propolio ekstraktų poveikis ląstelių gyvybingumui: tipinės nuotraukos A – kontrolė, B – ląstelės, inkubuotos 24 h oksidacinio streso (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sąlygose, C – 10 µg/ml PC, D – 20 µg/ml PC, E - 30 µg/ml PC, F - 40 µg/ml PC, G - 50 µg/ml PC.

Pateikiant paraišką buvo planuoti laukiami tyrimo rezultatai, planuojama pateikti produkcija:

Kadangi propolio ekstraktų poveikis žmogaus dermos ląstelėms nėra žinomas, tai buvo šiame etape planuota ištirta:

- Ar propolio tirpalai, pagaminti su skirtingais tirpikliais, turi skirtingą poveikį ląstelėms patologijos sąlygomis;
- Koncentracijų ribos, kuriose pasireiškia apsaugantis nuo pažeidimų propolio tirpalų poveikis;

Taip pat iš gautų duomenų paruošti mokslinį straipsnį.

Projekto eigoje padaryti tyrimai atsakė į visus šiuos klausimus ir jie pateikti Išvadų skiltyje. Taip pat paruoštas mokslinis straipsnis pateiktas 1 priede.

IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS (*pateikiamos išvados ir rekomendacijos, nors jos ir yra išdėstytos ataskaitos prieduose (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).*)

### Šio tyrimo išvados

- fenolinių junginių išskyrimas yra efektyvus gaminant propolio ekstraktus naudojant eutektinį tirpiklį ir kelių tirpiklių mišinį. Eutektinis tirpiklis ir kompleksiniai hidrofiliniai tirpikliai yra potencialūs propolio veikliųjų junginių nešikliai iš žaliavos;
- eutektinis mišinys ir etanolinis tirpiklis, panaudoti 1,5 – 2 % koncentracijomis, turi ląstelių metabolinį aktyvumą mažinantį poveikį, todėl patartina šiuos ekstraktus į ląstelių kultūrą pridėti 1 % ir mažesnėmis koncentracijomis.
- propolio biologiškai aktyvios medžiagos, panaudotos 20-40 µg/ml PC, efektyviai apsaugo žmogaus dermos ląsteles nuo oksidacinio streso pažeidimo.

### NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.

1. Dominguez-López, I., Pérez, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2024). Total (poly) phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(27), 10048-10054.
2. Dugar, R. P., Gajera, B. Y., & Dave, R. H. (2016). Fusion method for solubility and dissolution rate enhancement of ibuprofen using block copolymer poloxamer 407. *AAPS PharmSciTech*, 17, 1428-1440.
3. Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Bubalo, M. C., Frece, J., ... & Redovniković, I. R. (2018). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 14188-14196.
4. Stanciauskaite, M., Marksa, M., Babickaite, L., Majiene, D., & Ramanauskiene, K. (2021). Comparison of ethanolic and aqueous *Populus balsamifera* L. bud extracts by different extraction methods: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Pharmaceuticals*, 14(10), 1018.
5. Stanciauskaite, M., Marksa, M., Liaudanskas, M., Ivanauskas, L., Ivaskiene, M., & Ramanauskiene, K. (2021). Extracts of poplar buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of their composition and biological activities. *Plants*, 10(5), 828.
6. Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 731940.
7. Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1, 1-4.
8. Zhang, J., Cao, X., Ping, S., Wang, K., Shi, J., Zhang, C., ... & Hu, F. (2015). Comparisons of ethanol extracts of Chinese propolis (poplar type) and poplar gums based on the antioxidant activities and molecular mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 307594.

### PRIEDAS 1

*Parengtas spaudai mokslinis straipsnis „Comparison of biological activity of differently prepared propolis extracts in dermal cells under oxidative stress conditions”*