

ZDZISŁAW GLIŃSKI, TADEUSZ MERESTA *

Próba standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej kitu pszczelego

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

Summary

Trials to standardize an antibacterial activity of propolis

Studies on the antibacterial action of 592 samples of propolis from various regions of Poland showed that ethanolic extracts of propolis differ by their antibacterial activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts ranged from 60 to 490 µg/ml and the minimal bactericidal concentration (MBC) ranged from 110 to 1680 µg/ml for *Staphylococcus aureus* 209P (Oxford). Samples of propolis of a determined bacteriostatic activity differ clearly by the MBC values. Therefore, standardization of propolis should be based both on the MIC and MBC values. Authors suggest that the most active propolis should characterize the MIC below 300 µg/ml and the MBC not more than 450 µg/ml. The methods of extraction and antibacterial activity determination have to be strictly defined because they affect both the MIC and MBC of propolis.

z charakterem flory oblatywanej przez pszczoły i warunkami klimatycznymi.

Ze względu na występowanie różnic w aktywności biologicznej związanej ze źródłem pochodzenia propolisu zachodzi konieczność podejmowania badań nie tylko nad składem chemicznym i efektywnością terapeutyczną oraz nad szeroko pojętym działaniem ubocznym propolisu (działanie teratogenne, karcynogenne, mutagenne) na organizm zwierząt, ale także nad opracowaniem kryteriów standaryzacji aktywności biologicznej propolisu. Określenie aktywności przeciwbakteryjnej oznaczonej wartościami minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) oraz zależności pomiędzy tymi wartościami jest przedmiotem prezentowanych badań. W oparciu o uzyskane wyniki podjęto próbę opracowania kryterium standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej etanolowych wyciągów kitu pszczelego.

Materiał i metody

Propolis. W badaniach użyto 592 próbek propolisu uzyskanych w okresie produkcji letniej (czerwiec-lipiec), pochodzących z pasiek usytuowanych w różnych rejonach Polski. Próbkę propolisu przetrzymywano w ciemności w 4°C.

Ekstrakty etanolowe propolisu (EEP). Propolis ekstrahowano mieszaniną alkohol etylowy-aceton-eter etylowy-octan etylu (1:1:1:1, v/v) w stosunku wagowym propolis — ekstrahent wynoszącym 1:10, w 18°C przez 48 godz., wstrząsając co 6—8 godz. Z ekstraktu przesączonego przez bibułę filtracyjną wytrącono w -10°C (2—4 godz.) substancje woskowe. Po przesączeniu ekstrahent odparowano (37°C), a otrzymaną ciemnobrunatną substancję o charakterystycznym zapachu rozpuszczono w 96% etanolu do stężenia końcowego 20 mg/ml (16). Ekstrakty przechowywano w zamkniętych naczyniach szklanych w 18—20°C. Uzyskane ekstrakty służyły do określenia wartości MIC i MBC.

Wartość MIC. Wartość minimalnego stężenia hamującego określono w stosunku do *Staphylococcus aureus* 209P (Oxford) na podłożu stałym o pH 6,5—6,8 wg Jeliśzewicza (14) w modyfikacji własnej. Modyfikacja polegała na eliminacji z podłoża glukozy i fosforanu. Do podłoża o temp. około 50°C dodawano ekstrakty EEP we wzrastającym stężeniu w postępie arytmetycznym do końcowego stężenia od 10 do 600 µg/ml podłoża. Podłoże posiewano 6 godz. hodowlą bulionową (pH 7,4) *S. aureus* 209P w ilości 0,05 ml hodowli rozcieńczonej 1:100 na szalkę Petriego o średnicy 8 cm. Wyniki odczytywano po 16—29 godz. inkubacji w 37°C. Za minimalne stężenie hamujące (MIC) przyjmowano najniższe końcowe stężenie EEP, które hamowało całkowicie wzrost standardowego szczepu *S. aureus* 209P. Kontrolę stanowiło podłoże bez dodatku EEP zawierające kolejne rozcieńczenia alkoholu etylowego, które posiewano identycznym inokulum *S. aureus* 209P.

Wartość MBC. Do serii podłoży płynnych wg Grove i Randalla (13) o pH 6,5—6,8 dodawano EEP do końcowego stężenia od 10 do 600 µg/ml podłoża. Następnie dodawano 3×10^5 komórek *S. aureus* 209P/ml podłoża z 6 godz. hodowli bulionowej. Po inkubacji 20—24 godz. w 37°C z serii podłoży płynnych, w których wystąpiło zahamowanie wzrostu widoczne nieuzbrojonym okiem, posiewano 0,05 ml na podłoże stałe z agarem odżywczym (pH 7,4), które inkubowano przez 48 godz. w 37°C. Za wartość MBC przyjmowano najniższe stężenie EEP w podłożu płynnym, przy którym nie uzyskano wzrostu referencyjnego szczepu *S. aureus* 209P na podłożu stałym. Kontrolę stanowiły podłoża płynne wg Grove i Randalla posiane *S. aureus* 209P bez dodatku EEP, a zawierające kolejne rozcieńczenia etanolu, które posiewano na

Preparaty oparte o surowce pochodzenia naturalnego są coraz powszechniej stosowane w terapii człowieka i zwierząt. Ostatnio wzrosło zainteresowanie kitem pszczelim (propolis) jako substancją pochodzenia naturalnego o właściwościach leczniczych (9, 26, 30, 32). Poznanie składu chemicznego i farmakodynamiki tych substancji jest warunkiem niezbędnym do ich oceny jako leków. Jakkolwiek piśmiennictwo dotyczące składu chemicznego i właściwości biologicznych różnych ekstraktów propolisu jest dość obfite (12), to jednak istnieją duże rozbieżności zarówno co do składu chemicznego i właściwości biologicznych, a zwłaszcza aktywności przeciwdrobnoustrojowej propolisu.

Pod względem chemicznym propolis stanowi bardzo złożoną mieszaninę aminokwasów, kwasów alifatycznych o długim łańcuchu węglowym i lotnych kwasów o krótkim łańcuchu węglowym (11), kwasów aromatycznych i ich estrów, alkoholi, aldehydów, chalkonów (9), dwuhydrochalkonów (8), flawononów i flawonów (5, 7), flawanoli, węglowodorów, ketonów, terpenoidów i steroli (31). Aktywność przeciwbakteryjna propolisu różni się wyraźnie nie tylko w zależności od jego składu chemicznego (25) ale także od proporcji pomiędzy poszczególnymi składnikami. Stężenie kwasu kawowego i jego estrów, które zdaniem Schneidewind i wsp. (25) warunkują znaczną część aktywności przeciwbakteryjnej waha się od 2 do 20% (10). Również stężenie pinocembryny (5,7-dwuhydroksyflawanonu), która jest uważana za drugi ważny składnik warunkujący aktywność przeciwbakteryjną propolisu — waha się od 1 do 36%. Istnieją też doniesienia wskazujące na różny skład i aktywność propolisu w zależności od rodzaju producenta. Propolis z Ekwadoru produkowany przez pszczoły bezżądłowe nie zawiera kwasów aromatycznych i ich estrów, flawonów i flawononów, podczas gdy propolis produkowany w Europie przez *A. mellifera* posiada te substancje (12). Wykazano też, że propolis pochodzące z różnych terenów Polski różnią się wyraźnie aktywnością przeciwbakteryjną (17, 18, 26), przy czym różnice te są związane

agar odżywczy (pH 7,4) i inkubowano przez 48 godz. w 37°C.

Celem zobiekttywizowania wyników badań nad zależnościami między wartościami MIC i MBC wyciągów propolisu, uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta przy istotności alfa = 0,05.

Wyniki i omówienie

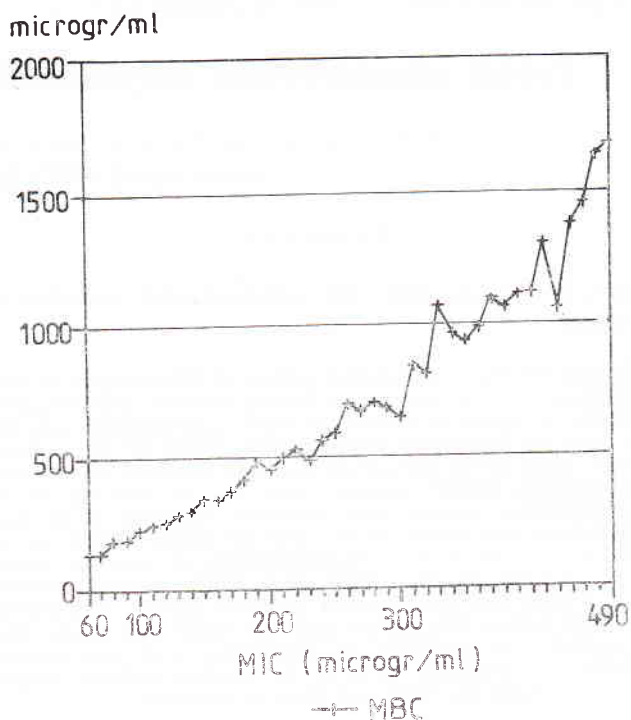
W otrzymywaniu aktywnych biologicznie wyciągów propolisu kluczową rolę odgrywa rodzaj użytych ekstrahentów oraz metody ekstrakcji. Stąd też w badaniach zastosowano do ekstrakcji mieszaninę: etanol-eter etylowy-aceton-octan etylu oraz 48 godz. czas ekstrakcji w 37°C. Użyte ekstrahenty umożliwiły rozpuszczenie większości związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym zawartych w kicie pszczelim. Nie wpływały one przy tym ujemnie, względnie tylko w minimalnym stopniu, na aktywność przeciwbakteryjną wyciągów badanych. Temperatura odparowania rozpuszczalników użyta w badaniach nie wpływała na wartość MIC ekstraktów w stosunku do *S. aureus* 209P.

Zastosowanie do oznaczania wartości MIC wg podłoża Jeliaszewicza, a MBC podłoża wg Grove i Randalla umożliwiło nie tylko uzyskanie dobrego wzrostu szerepu referencyjnego gronkowca, ale wykluczało działanie hamujące składników podłoża na aktywność przeciwbakteryjną wyciągów propolisu. Mając na uwadze stwierdzone uprzednio (17) zależności między wartościami MIC i MBC a czasem odczytu wyników oznaczania tych wartości, wyniki odczytywano po 18–24 godz. inkubacji. *S. aureus* 209P niezależnie od wieku hodowli okazał się w jednakowym stopniu wrażliwy na działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze wyciągów propolisu.

Badane próbki propolisu różniły się zarówno wartościami MIC, jak i MBC. Zakres wartości MIC wahał się od 60 do 490 µg/ml podłoża, zaś MBC wynosił od 110 do 160 µg/ml podłoża. W większości przypadków obserwowano tendencję do wzrostu wartości MBC wraz ze wzrostem wartości MIC (ryc. 1). Ta tendencja zarysowuje się bardzo wyraźnie dla wartości MIC od 60 do 150 µg/ml. Ekstrakty propolisu o aktywności przeciwbakteryjnej w tym zakresie stanowią 48,9% badanych próbek. Ich aktywność bakteriobójcza oznaczona wartościami MBC mieści się w granicach od 110 do 450 µg/ml. Ekstrakty propolisu o wartościach wyższych od 160, a nie przekraczających 300 µg/ml stanowiły 42,8% badanych próbek. Natomiast wartości MBC dla tych próbek wahały się od 110 do 1500 µg/ml z tym, że dla 23,9% (142) próbek wartości MBC mieściły się w granicach 460–900 µg/ml. Ekstrakty propolisu o MIC od 310 do 490 µg/ml stanowiły 8,3% wszystkich badanych próbek. Wartość MBC dla tych ekstraktów wynosiła od 460 do 1680 µg/ml. Największa liczba próbek z tej grupy bo 75,5%, miała wartość MBC w granicach 110–1500 µg/ml. Godnym uwagi jest fakt, że 398 ekstraktów EEP (67,2%) miało wartość MBC poniżej 450 µg/ml, a tylko 152 (25,6%) próbki mieściły się w granicach wartości MBC od 460 do 900 µg/ml.

Ekstrakty propolisu bardzo aktywne o wartości MIC od 60 do 180 µg/ml, a także ekstrakty o niskiej aktywności (MIC = 330 i powyżej) różnią się znacząco przy alfa = 0,05 aktywnością bakteriobójczą wyrażoną wartościami MBC.

Leki muszą spełniać kryteria, które umożliwiają identyfikację zawartych w nich substancji czynnych, zakres i nasilenie działania farmakologicznego. Nie mniej ważne w ocenie leków są metody oznaczenia tych parametrów. Te same kryteria odnoszą się również do wycią-



Ryc. 1. Kształtowanie się zależności pomiędzy wartościami minimalnego stężenia hamującego (MIC) i średnimi wartościami minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) etanolowych wyciągów propolisu (n = 592) w stosunku do *S. aureus* 209P

gów propolisu, ponieważ preparaty zawierające kit pszczeli są coraz częściej stosowane w oficjalnej medycynie. Propolis jest wykorzystywany też jako środek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, głównie w przypadku bakterii opornych na znane antybiotyki i chemioterapeutyki. Wykazano np. przydatność preparatów zawierających propolis w medycynie w leczeniu ropnych zapaleń skóry o etiologii bakteryjnej (2, 4, 20), czyracych (22), owrzodzeniach troficznych i odleżynach (15), ropnych zapaleniach kości (23), zakażonych ran z dużymi ubytkami tkanek (1). W weterynarii są stosowane wyciągi propolisu w leczeniu trudno gojących się ran psów i kotów (3, 27), zapaleń gruczołu mlekowego krów wywołanych przez bakterie odporne na antybiotyki (18). Większość bakterii gram dodatnich i prątki gruźlicy (24) oraz *Saccharomyces*, *Aspergillus* (28) i *Candida albicans* (18) są wrażliwe na ekstrakty propolisu.

Kryterium składu chemicznego substancji, które odpowiadają za aktywność przeciwbakteryjną propolisu, nie jest przydatne w ocenie tego działania. Pomimo różnic w składzie chemicznym, propolis mogą wykazywać zbliżoną aktywność ze względu na fakt istnienia dużych różnic w aktywności przeciwbakteryjnej poszczególnych składników. Dotychczas zidentyfikowano w propolisie około 130 związków chemicznych (12). Wśród nich są związki o silnym działaniu przeciwbakteryjnym jak flawonoidy (29), hydroksykwasy, alkohole i aldehydy (21), kwasy aromatyczne i ich estry (5, 25). Sytuację pogarsza fakt, że rodzaj rozpuszczalników użytych do ekstrakcji i metody ekstrahowania wpływają zarówno na skład chemiczny, jak i na aktywność otrzymanych wyciągów propolisu (6, 16). Zdano sobie też sprawę z częstego braku korelacji między występowaniem jednego lub kilku związków chemicznych w propolisie a aktywnością przeciwbakteryjną ekstraktów. Co więcej, analiza składu chemicznego propolisu jest możliwa do

wykonania tylko w warunkach wysoce wyspecjalizowanych laboratoriów analitycznych. Stąd też uzyskane wyniki dotyczące składu chemicznego nie mogą stanowić dostatecznego kryterium standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej. Dopiero badania nad działaniem wyciągów propolisu w stosunku do określonych rodzajów drobnoustrojów i nad skutecznością terapeutyczną w ściśle kontrolowanych warunkach eksperymentu, mogą decydować o przydatności propolisu jako leku. Wiadomym jest, że mechanizm działania propolisu jest złożony. Nie jest on całkowicie wyjaśniony na poziomie komórkowym i molekularnym. Efekt ostateczny działania bakteriostatycznego i bakteriobójczego nie jest z pewnością tylko sumą działań poszczególnych składników propolisu. Działania te są uwarunkowane wpływem wielu składników na błonę cytoplazmatyczną i komórkową, w mniejszym stopniu dotyczą wpływu na szlaki metaboliczne białek i syntezę kwasów nukleinowych komórki bakteryjnej.

W świetle przeprowadzonych badań, uprzednich obserwacji (16) i badań (26), najodpowiedniejszym kryterium oceny aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów propolisu wydaje się być wartość MIC, a także wartość MBC. Te dwie wartości w pełni charakteryzują aktywność przeciwbakteryjną jeżeli są oznaczone wg sposobów podanych w rozdziale Materiał i metody. Scheller (24) badając kilkaset próbek propolisu zebranych w ciągu kilku lat wykazał, że tylko 40% działa hamująco w stosunku do *S. aureus* 209P. Spośród 91 próbek propolisu pochodzących z różnych geograficznie rejonów Polski wartość MIC dla 41,7% prób wynosiła do 600 µg/ml, dla 13,1% od 601 do 1200 µg/ml i dla 42,5% wynosiła powyżej 1201 µg/ml (26). Podano więc sugestie przyjęcia wartości MIC za kryterium aktywności, uznając za ekstrakty silnie aktywne wyciągi o wartości MIC od 150 do 600 µg/ml, mniejszej aktywności od 601 do 1200 µg/ml i nieaktywne o MIC powyżej 1200. W doborze metod mikrobiologicznego oznaczania wartości MIC i MBC kluczową rolę odgrywa dobór odpowiedniego szczepu referencyjnego — jest nim *S. aureus* 209P (Oxford), rodzaj podłoża (podłoże Jeliaszewicza i Grove Randall, ich pH (6,5—6,8), gęstość inokulum drobnoustroju referencyjnego, czas odczytu wyników MIC 18—24 godz.) oraz dobór takich metod ekstrakcji propolisu i rodzajów ekstrahentów, które umożliwią otrzymanie wyciągów aktywnych pod względem działania przeciwbakteryjnego.

Wydaje się, że przy stwierdzonych w badaniach własnych różnicach w aktywności bakteriostatycznej i bakteriobójczej wyciągów propolisu można postulować w przypadku propolisu, podobnie jak i innych substancji przeciwbakteryjnych, użycie drugiego kryterium standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej, jakim jest wartość MBC. Różnice w wartościach MIC i MBC występują bowiem nie tylko pomiędzy propolisami różniącymi się źródłem pochodzenia, ale też pomiędzy propolisami pochodzącymi z tej samej pasieki (19), a także pomiędzy propolisami o identycznych wartościach MIC (16).

W oparciu o uzyskane wyniki sugeruje się przyjęcie za kryteria standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej wyciągów propolisu następujących wartości MIC i MBC: grupa I — wartość MIC do 300 µg/ml i MBC do 450 µg/ml; grupa II — MIC do 490 µg/ml, MBC do 900 µg/ml i grupa III — wartość MIC powyżej 300 µg/ml i MBC powyżej 900 µg/ml. Kryteria te mogą mieć zastosowanie wyłącznie do wyciągów etanolowych pro-

polisu uzyskanych mieszaniną rozpuszczalników wg sposobu podanego w rozdziale Materiał i metody, których aktywność oznaczono metodą mikrobiologiczną w stosunku do *S. aureus* 209P na podłożu stałym wg Jeliaszewicza i podłożu płynnym wg Grove i Randall.

Wnioski

1. Występowanie wyraźnych różnic w aktywności etanolowych wyciągów propolisu pochodzącego z różnych pasiek w stosunku do *S. aureus* 209P wskazuje na potrzebę standaryzacji wyciągów kitu pszczelego pod względem ich aktywności przeciwbakteryjnej.

2. Fakt, że próbki propolisu o określonej wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) mogą różnić się bardzo znacznie aktywnością bakteriobójczą, określoną wartością minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC), wskazuje na potrzebę przyjęcia za podstawę standaryzacji aktywności przeciwbakteryjnej propolisu oprócz wartości MIC również MBC.

3. Ze względu na możliwość zmiany wartości MIC i MBC w zależności od rodzaju ekstrahentów, metody i warunków ekstrakcji propolisu, a także metod oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej, zarówno metody ekstrakcji, jak i sposób standaryzacji powinny być ściśle określone.

Piśmiennictwo

1. Alijfer B. B.: Vestn. Otolaryng. 30, 105, 1938.
2. Chorążak T., Szafiarski J., Seferowicz E., Scheller S.: Przeglad Lek. 23, 828 1971.
3. Furowicz A., Iliewicz L., Stojko A.: Przeglad Stomatol. 133, 28, 1964.
4. Gabryś A., Winiowska E., Zahaczewska M.: Medycyna Wet. 29, 530, 1973.
5. Ghisalberti E. I.: Bee World 60, 59, 1979.
6. Gliński Z., Jarosz J., Meresta T.: Medycyna Wet. 43, 74, 1987.
7. Greenaway W., English S., Wollenweber E., Whatley F. R.: J. Chromat. 481, 352, 1989.
8. Greenaway W., May J., Whatley F. R.: J. Chromat. 472, 393, 1989.
9. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R.: Proc. R. Soc. Ser. B 232, 249, 1987.
10. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R.: Z. Naturforsch. 44c, 153, 1988.
11. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R.: Flavour Fragrance J. 4, 173, 1989.
12. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R.: Bee World 71, 107, 1990.
13. Grove D. C., Randall W. A.: Assay methods of antibiotics: A laboratory manual. Medical Encyclopaedia, New York 1955.
14. Jeliaszewicz J., Cybulska J., Hawiger J., Zak C.: Ziarenkowce gram dodatnie, biologia, rozpoznawanie i różnicowanie. PZH, Warszawa, 1969.
15. Kubacka S.: Zastosowanie propolisu w leczeniu ubytków tkanek i długotrwałych procesów ropnych. Praca dokt. AM Katowice, 1975.
16. Meresta T.: Badania nad czynnikami wpływającymi na aktywność przeciwbakteryjną ekstraktów kitu pszczelego (propolisu). Praca dokt. AR Lublin, 1992.
17. Meresta T., Meresta L.: Bull. Inst. Vet. Puławy 28, 1, 1985.
18. Meresta T., Meresta L.: Medycyna Wet. 41, 489, 1985.
19. Meresta T., Meresta L.: Pszczelarstwo 3, 4, 1986.
20. Muresen E., Gaboreanu M., Baga A. I.: IInd Apimondia Int. Symp. Apitherapy, Bukareszt, 1976, s. 35.
21. Poprawko S. A.: Pchelovodstvo 56, 39, 1976.
22. Scheller S., Seferowicz E.: Bull. Int. Congr. Apimondia, Moskwa 1971, s. 29.
23. Scheller S., Stojko A., Szwarnowiecka I., Tustanowski J., Obuszko Z.: Drug Res. 27, 2138, 1977.
24. Scheller S., Rogala D., Stasiak E., Zurek H.: Pol. Arch. Wet. 11, 391, 1968.
25. Schneidewind E. M., Buge A., Kala H., Metzner T., Zcunke A.: Pharmazie 34, 103, 1979.
26. Stojko A.: Doświadczalne i kliniczne badania nad stosowaniem propolisu. Praca habil. Instytut Wet., Puławy, 1978.
27. Stojko A., Furowicz A. J.: Medycyna Wet. 36, 110, 1980.
28. Vechet L.: Včelarstvi 26, 226, 1973.
29. Villaneuva V. R., Bogdanovskij D., Barbier M., Lavie P.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 106, 392, 1964.
30. Walker A. P.: Annotated bibliography on propolis. IBRA no 15, 1976.
31. Walker P., Crane E.: Apidologie 18, 327, 1987.
32. Whatley F. R., Greenaway W., May J.: Z. Naturforsch. 44c, 352, 1989.

Adres autora: prof. zwyczaj. dr habil. Dżdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin