

Effects of Propolis on 808 nm Laser Induced Wounds

Jang-In Shin¹, Chung-Ku Rhee^{1,2}, Seung-Wan Lee³ and Jin-Chul Ahn^{1,2†}

¹Medical Laser and Device Research Center, ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Dankook University, ³Seoul Propolis Co., Ltd

Wound healing is a complex and highly organized biological response to injury that results in the loss of tissue integrity. Our particular interest was propolis, traditional used as an antimicrobial and an anti-inflammatory agent. The purpose of this study was to see the effects of propolis on healing of the laser induced wounds and the level of collagen formation. 808 nm laser (20 J) was irradiated on the back of rats. Irradiated wounds were divided into gel control and 6 experimental groups (3 and 5% of different three kinds of propolis). Gel type of propolis (supplied by Seoul Propolis Co., Daejeon, Korea) in water based were applied on the laser wound once daily for 14 days. One fourth of rats were sacrificed on 3rd, 7th, 10th, and 14th day and each wound was evaluated for degree of wound healing and the level of collagen formation. Healing of wound was evaluated by measuring and comparing the width and depth of the wounds. The levels of collagen were increased in 3 and 5% gel groups comparing to control on 3rd day and the collagen level were increased more on 7th day. Wounds of the experimental groups showed better healing in width comparing to the healing of the control. The results of this study demonstrated that propolis accelerated healing of wounds induced by laser irradiation and good collagen formation.

Key Words: Propolis, Wound healing, Collagen

서 론

피부는 인체의 표면을 세균이나 감염성 물질로부터 보호하고, 온도와 감각 기능 등을 조절하는 중요한 역할을 담당한다. 따라서 외부와 경계부에 위치하는 피부는 지속적인 외부 자극이나 물리적, 기계적 자극으로 인해 쉽게 손상 받을 수 있다. 피부가 손상되면 피부 상처의 치유과정은 수많은 세포의 조절 작용을 포함하는 매우 복잡한 과정을 거쳐 이루어지고 치유과정은 염증기, 상피화기 그리고 재형성기의 과정으로 치유된다 (Kim and Jeon, 2000). 이러한 외상성 손상이나 광범위한 피부 손상을 치유하기 위해 다양한 치료 도구들이 임상적으로 사용되어 왔다.

최근 각종 질병들에 대한 저항능력을 유도할 수 있는 다기능성 천연물질들에 대한 연구들이 활발히 진행되고

있으며 그 중 새로운 항산화제로서 관심이 집중되고 있는 것은 프로폴리스인데 이는 꿀벌이 유해한 세균이나 바이러스로부터 벌집을 보호하고 청결한 환경을 유지하기 위하여 수목에서 모집한 수액에 봉납이나 타액을 혼합시켜 만든 점착성이 있는 수액상의 천연물질로서 고대로부터 동구권을 중심으로 민간요법 약제로 널리 알려져 왔다 (Monti et al., 1983).

프로폴리스에 대한 사용은 기원전 1세기경 Plink의 저서 "Historia naturalis"에 신경통 격감, 부종 억제, 농양 치료제 등으로 이용되며, 고대로부터 프로폴리스의 약리학 적 중요성에 대한 연구가 진행되어 왔으며 최근에는 소염, 정균, 방부, 마취효과 등을 이용해 화장품, 건강식품 및 고혈압, 아토피성 피부염 치료제 등에 사용되고 있다 (Munstedt, 2001). 현재까지 프로폴리스의 항균 작용, 항염증 작용, 면역조절 작용, 항케양 작용, 항고혈압 작용, 항산화 작용, 간장보호 작용, 항암 작용, 상처 치유효과 등이 밝혀지고 있으며 빈혈, 순환기계 질환, 알레르기성 염증, 관절염, 소화기계 염증, 비뇨기 및 생식기계 염증, 신경계 질환 등의 개선효과가 있음이 밝혀졌다 (Han et al., 2003; Rhim et al., 2002; Hur et al., 2007; Kim and Yoo, 2008; Son, 2003; Cho et al., 2006; Kim et al., 2009; Marcucci et

*접수일: 2009년 9월 3일 / 수정일: 2009년 9월 12일

채택일: 2009년 9월 14일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29번지, 단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터

Tel: 041-550-1786, Fax: 041-550-1788

e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

al., 2001). 프로폴리스의 주요 활성성분은 2가의 phenyl기와 pyran환을 기본으로 하는 식물 색소인 플라보노이드이며, 그 외에 유기산류, 페놀산류, 방향족 알코올, 알데하이드류, 쿠마린류, 비타민류, 미네랄류 등과 같은 160여 가지 이상의 다양한 성분들로 구성되어 있다 (Hur et al., 2007). 항균효과는 수지 중에 포함되어 있는 페놀성 화합물에 의해 주로 발휘되는 것으로 알려져 있으나, 프로폴리스는 물에 대한 용해도가 매우 낮으며, 물과 혼합하면 고형의 덩어리가 형성되고 기벽에 달라붙어 성상이 조잡해지며, 특이한 향으로 인하여 식품 첨가물, 기능성 식품 및 화장품 등의 이용에 한계가 있다.

본 연구는 프로폴리스가 상처 치유효과, 항균 및 항바이러스 등의 효능을 갖고 있는 점에 착안하여 쥐에게 레이저를 조사해 창상을 만들고 프로폴리스를 도포함으로써 창상 치유에 효과가 있는지 또 이때 대조군에 비해 콜라겐의 생성량에 어떤 영향을 끼치는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 창상 제작

SD female rat (250 g)을 분양 받아 7일간의 적응기간을 거친 후 줄레틸 (Virbac Laboratories, France)과 xylazine hydrochloride (립폰, 한국바이엘, 대한민국)을 4:1로 섞은 용액을 0.1 µl 주사하여 마취시킨 후 실험을 시행하였다.

제모크림으로 척추후방의 털을 제거하고, 4 등분하여 4군으로 나누고 808 nm (LAS-30 A; 1.0 W, 20 sec)로 조사하여 군당 7개의 창상을 만든다. 실험 시작 3, 7, 10, 14일 후 조직을 채취해 이 중 3개의 창상은 조직학적인 염색에 사용하고 4개는 콜라겐 정량에 사용하였다.

2. 프로폴리스 도포

실험에 사용한 프로폴리스는 (주) 서울 프로폴리스에서 기증받았다. 실험군은 겔 타입의 프로폴리스에 대한 대조군으로 gel control을 비롯해 세 종류의 프로폴리스 (B, C, D)를 총 플라보노이드 함량이 3과 5%로 다르게 하여 총 6군의 프로폴리스군으로 나누었다.

창상 제작한 다음날부터 매일 오전에 프로폴리스를 창상 부위에 도포하였으며 실험 시작 3, 7, 10, 14일 후 오 후에 조직학적인 염색 및 콜라겐 정량 등의 실험을 위해 창상 조직을 채취하였다.

3. 조직학적 염색

조직학적인 변화를 관찰하기 위해 창상을 적출해 4% paraformaldehyde에 24시간 동안 고정하였다. 조직을 파라핀에 포매하고 조직 절단기 (Leica, HI-1210, Ger)를 사용하여 4 µm 두께로 조직을 잘라 sialinized slide에 부착시켜 슬라이드 제작하고 H&E (hematoxylin and eosin)염색과 Masson's Trichrome 염색을 시행하였다.

즉, 슬라이드의 절편을 탈파라핀 시키고 함수과정을 거친 후 hematoxyline 용액에 5분간 반응시키면 hematoxylin의 산화과정에 의해 생성된 hematein이 매염제와 결합하여 양전하를 띠게 되어 음전하를 띤 핵 내 인산기에 결합해서 청색으로 염색된다. 이를 흐르는 물에 5분간 씻어내고 eosin에 2분 동안 반응시키면 음전하를 띤 eosin과 양으로 하전되어 있는 세포질이나 결합 조직이 결합하여 분홍색으로 염색된다. 이를 흐르는 물에 씻어내고 탈수과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경으로 조직학적인 변화를 관찰하였다.

두 번째로 조직학적으로 콜라겐의 변화를 살펴보기 위해 Masson's Trichrome collagen 염색 (MT staining)을 실시하였다. 슬라이드의 절편을 탈파라핀 시키고 bouin 용액에 1시간 담근 뒤에 weigert hematoxyline 용액과 biebich scarlet acid fuchsin 용액으로 근육과 콜라겐을 적색으로 염색시킨 후, phosphomolybdic-phosphotungstic acid로 콜라겐을 탈색시키고 염기성 염료인 aniline blue 용액을 이용하여 콜라겐을 파랗게 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 콜라겐 정량

프로폴리스가 조직의 콜라겐 생성에 영향을 미치는지 정량적으로 분석하기 위해 Sircol™ solution collagen assay kit (Bicolor Ltd., Northern Ireland)을 사용하였다. 창상 조직을 채취하여 무게를 측정하여 10배의 0.5 M acetic acid 용액을 넣고 4℃에서 18시간 동안 교반한 후 15,000 g, 60분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해 50 µl와 0.5 M acetic acid 50 µl를 섞는다. 이때 collagen standard도 12.5, 25, 50 µg이 되게 같이 준비한다. 1 ml의 sircol dye reagent를 넣고 30분 동안 교반시키면 Sircol reagent에 있는 sulphonic acid를 가지는 Sirius red 염색약이 조직의 콜라겐과 특이적인 반응을 통해 collagen-dye complex를 형성하게 된다. 10,000 g, 10분 동안 원심 분리 후 상층액을 제거하고 pellet에 alkali reagent를 첨가하여 콜라겐과 결

합되어 있는 dye를 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 콜라겐 농도를 계산한다.

결 과

5. 창상 치유 정도 측정

조직 염색이 끝난 슬라이드를 이용해 창상의 width와 depth 길이를 측정하여 실험 시작 3, 7, 10, 14일 후의 창상 치유되는 정도를 비교 분석하였다.

6. 통계처리

콜라겐 정량과 창상 치유 정도를 측정한 결과는 SPSS를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 하였고 유의수준 0.05에서 유의성 검증을 실시하였다.

피부의 상처회복과정 중 기질의 재형성은 상처회복의 시점을 얼마만큼 단축시키고 연장시키는가에 중요한 요인 중 하나이다. 따라서, 진피 내 콜라겐의 침착 정도와 양을 확인하는 것은 상처회복 조직을 분석하는데 중요하다. 이에 808 nm의 레이저를 이용해 진피층까지 창상이 형성되도록 유발시키고 대조군과 6개의 프로폴리스를 매일 도포한 후 3, 7, 10, 14일 후 조직을 채취하여 Masson's trichrome 염색을 이용해 비교 분석한 결과, 3일과 7일째 샘플에서 대조군에 비해 6개의 프로폴리스군

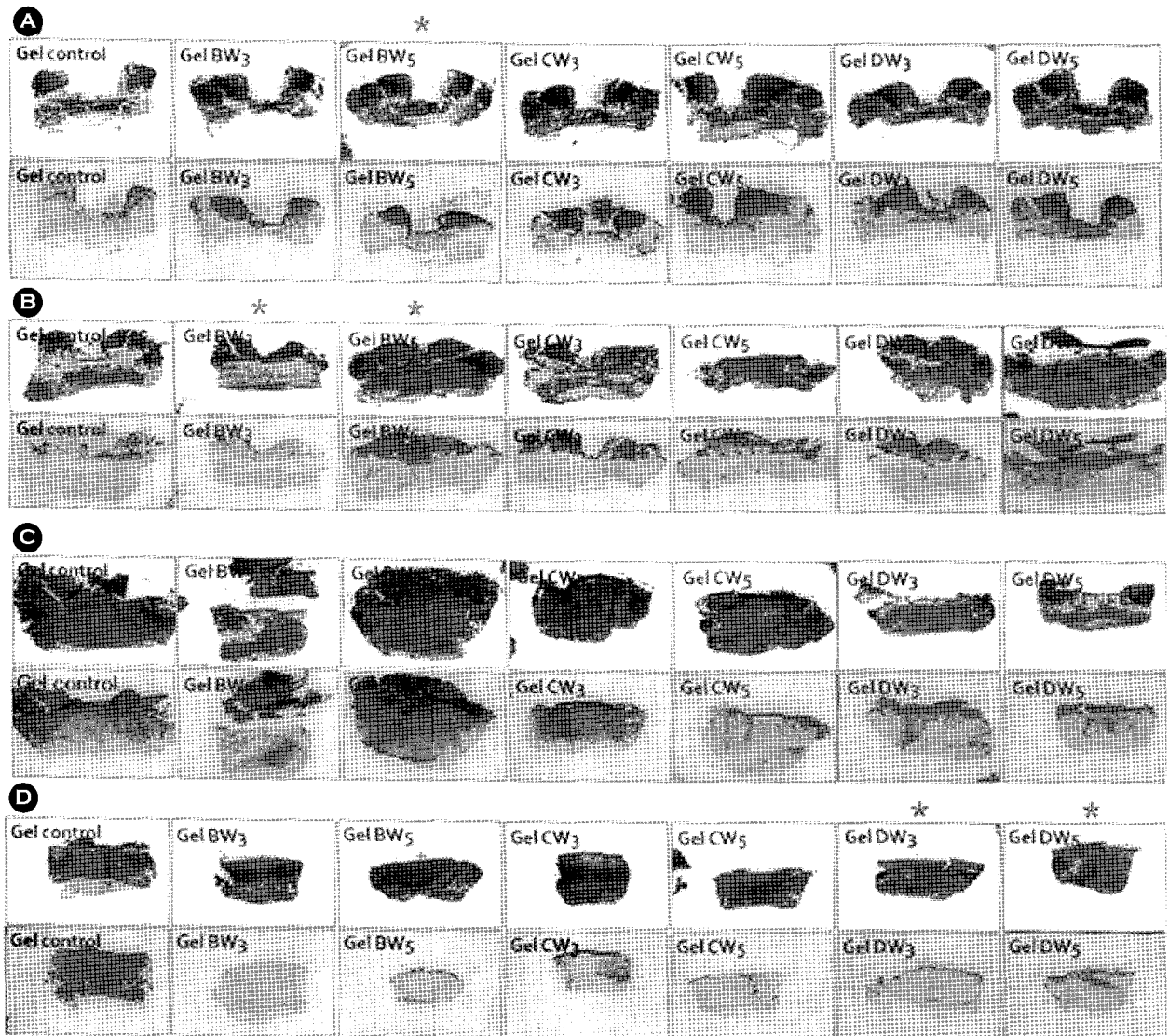


Fig. 1. Collagen accumulation in subcutaneous tissue of control and 6 experimental groups after 808 nm laser induced wound at 3rd (A), 7th (B), 10th (C) and 14th (D) day. Collagen and standard histological sections were stained with Masson's Trichrome and hematoxylin-eosin, respectively.

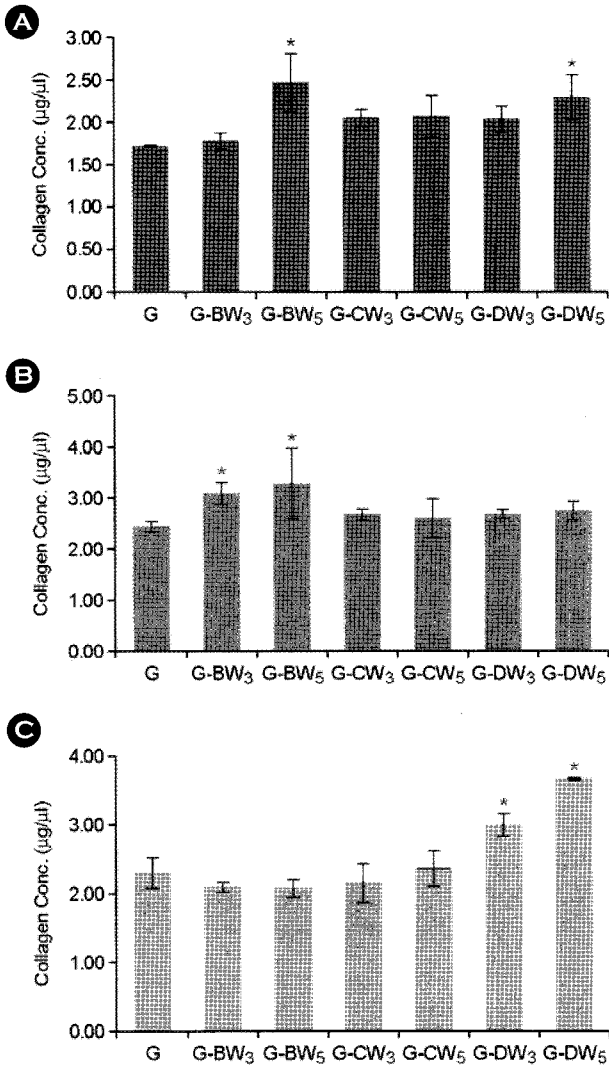


Fig. 2. Quantitative analysis of collagen of control and 6 experimental groups after 808 nm laser induced wound at 3rd (A), 7th (B) and 14th (C) day. The concentration of collagen was significantly increased than that of control, especially B and D propolis ($P < 0.05$).

모두 콜라겐의 분포가 증가함을 보였고, 10일 째에는 프로폴리스군 뿐 아니라 대조군에서도 콜라겐의 양이 증가하였으며 시간이 경과됨에 따라 손상 주변으로 상피화가 진행되면서 주변의 부종이 사라짐을 보였다. 14일 째에는 창상이 거의 치유됨을 보였으며 이때의 콜라겐은 대조군에 비해 프로폴리스군에서 더 많이 축적되었다 (Fig. 1).

각 군당 7개의 창상 중 3개는 조직학적인 변화를 관찰하고, 나머지 4개를 콜라겐 정량한 결과, 대조군에서도 시간이 경과됨에 따라 콜라겐의 양이 증가하는 경향을 보였다. 특히 3일째에는 B와 D 타입의 프로폴리스군에서 농도 의존적으로 콜라겐의 양이 증가함을 보였고 5%의 B와 D타입의 프로폴리스군은 대조군에 비해 유의성

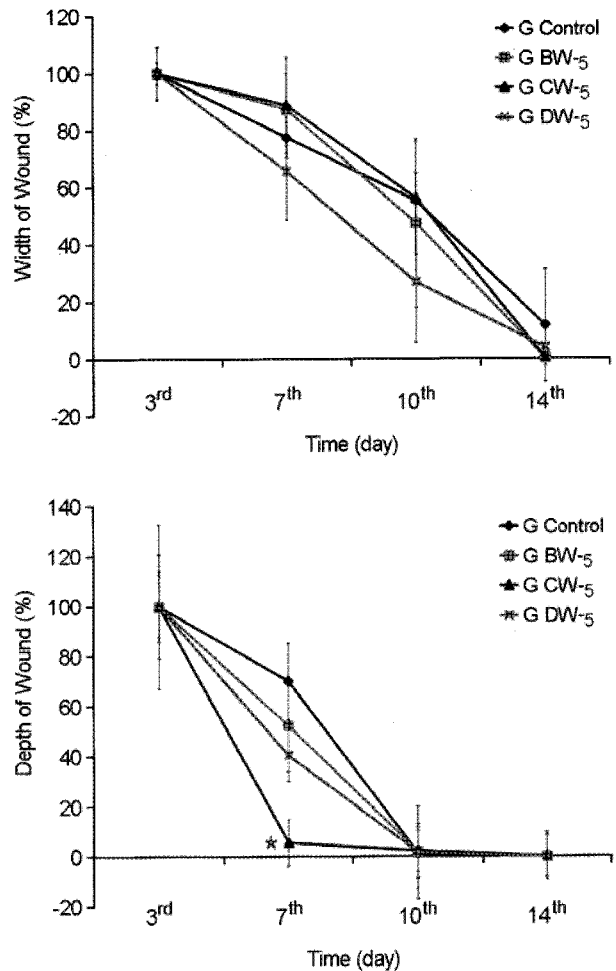


Fig. 3. The width and depth of control and three experimental groups (5% of B, C and D propolis). The depth of wound in three experimental groups was significantly decreased than that of control on the 7th day ($P < 0.05$).

이 있었다 (Fig. 2A). 7일째에는 전반적으로 대조군과 비슷해 보였으나 B타입의 프로폴리스군에서만 3과 5% 모두에서 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2B). 상처가 거의 치유된 14일 째는 오히려 D타입의 프로폴리스군에서만 유의성 있게 콜라겐의 양이 증가함을 보였다 (Fig. 2C).

조직 염색한 샘플을 사진 촬영한 후 창상의 width와 depth를 측정하여 시간이 경과함에 따라 대조군에 대한 창상의 치유 정도를 비교 분석하였다. 창상의 width를 비교했을 경우 대조군과 5%의 B, C, D 타입의 프로폴리스군 모두 비슷한 속도로 치유됨을 보였으나 그 중 D 타입의 프로폴리스군이 가장 효과가 있었으며, depth 역시 7일 째에는 3개의 프로폴리스군에서 모두 대조군에 비해 감소하였으며 특히 C 타입의 프로폴리스는 유의성이 있었다 (Fig. 3).

고 찰

피부는 외측으로부터 표피, 진피, 피하 조직으로 구성되어 있다. 표피는 케라틴으로 되어 있는 케라티노사이트, 멜라닌을 형성분비하는 멜라노사이트, 면역관련세포 및 지각관련세포 등의 여러 가지 세포로 이루어져 있다. 진피는 섬유성분과 기질성분으로 구성되어 있으며 섬유성분으로서 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 주고, 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있다. 엘라스틴은 진피층의 3~4% 정도를 차지하며 피부의 탄력에 영향을 준다. 콜라겐은 섬유아 세포의 작용에 의해 합성되며 collagenase와 elastinase에 의해 분해된다 (Kim et al., 2007).

피부가 외상 등으로 인해 창상을 입으면 염증기, 상피형성기, 재형성기의 여러 단계를 거치며 완전한 상처 치유와 조직 수복이 이루어진다. 초기 염증 반응 시 호중구가 출현하여 염증 반응에 관여하고, 상처 부위의 섬유아 세포가 조직 재생을 위해 상처 부위로 이동하며, 또한 각질세포는 손상면을 따라 이동하여 증식, 분화하는 일련의 과정을 진행한다. 활성화된 섬유아 세포는 손상 후 5일째 최대로 발달하게 되며 외상 후 2 주 동안 빠른 속도로 콜라겐을 합성하고 모세혈관이 증식하며, 최종적으로 type I 콜라겐이 형성됨으로써 조직 수복이 완성된다 (Kim and Jeon, 2000).

약물이 창상 치유에 미치는 영향에 대한 연구는 이전부터 많이 행하여져 왔다. 초기에는 실험 동물에 상처를 만든 다음 조직이 치유되는 부위의 육아 조직 자체의 무게를 측정하거나 (Dvivedi et al., 1997) 창상 부위의 장력을 직접 측정하는 연구에서 시작하여 (Haws et al., 1996; Margaret and Jamil, 1997) 최근에는 창상 부위의 콜라겐 및 그 전구물질의 농도를 측정하거나, 약물을 사용했을 경우 골모세포, 섬유모세포에서의 콜라겐 mRNA의 발현 양이나 각 단계의 효소의 농도를 측정하는 등의 분자 생물학 수준의 연구가 많이 진행되고 있다 (Fujii et al., 1989; Mauviel et al., 1988; Milyk et al., 1996; Pilbeam et al., 1997).

프로폴리스는 벌들이 다양한 식물의 진액물질을 채취할 때 침을 첨가시켜, 뜯어낸 뒤 밀납 등을 넣어 몇 개월간 30°C가 넘는 온도에서 숙성시켜 벌들이 사용하기 좋도록 만들어 놓은 물질이다. 이러한 식물의 진과 벌의 타액이 결합하여 만들어진 자연 항생물질인 프로폴리스는 우수한 항균, 살균, 항염 작용을 하는 성질을 가지고

있어 벌들은 이 프로폴리스를 벌집출입구에 발라 외부로부터 바이러스나 해로운 세균의 유입을 원천적으로 막고, 벌집 내부를 항상 청결한 상태로 유지하게 된다. 프로폴리스는 항염증, 항균, 살균, 항알레르기, 생체면역 강화, 면역력 활성화, 세포활성, 세포재생, 피부병, 화상 등에 대한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 프로폴리스 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분은 폴리페놀로 플라보노이드를 포함하고 있다 (Son, 2003).

Sud'ina 등 (Sud'ina et al., 1993)은 프로폴리스의 성분 중 caffeic acid가 lipoxigenase inhibitor로 작용한다고 보고하였으며, Krol 등 (Krol et al., 1996)과 Nardini 등 (Nardini et al., 1997)도 프로폴리스의 활성산소 소거 작용의 주성분의 하나로서 caffeic acid 등을 보고하였으며 Kimoto 등 (Kimoto et al., 2000)의 연구에서도 수용성 프로폴리스 성분 중 플라보노이드가 함유되어 있는 Artepillin C를 추출하여 항산화적 효능을 조사한 결과 긍정적인 영향을 미쳤다고 보고하였다. Banskota 등 (Banskota et al., 2000)은 이런 선행연구들을 토대로 보다 명확한 프로폴리스의 항산화적 능력을 조사하기 위해 프로폴리스 성분들을 총 31종으로 분류 추출하여 항산화능을 조사한 결과 프로폴리스의 수용성 성분들인 caffeate 성분들과 플라보노이드, cinnamic acid에서 높은 활성산소 소거능을 보고하였다.

본 연구에서는 프로폴리스 군에서 콜라겐의 형성이 증가함을 보였다. 실험 3일째에는 5% B와 D 타입의 프로폴리스군에서, 7일째에는 3과 5%의 B타입 프로폴리스군에서, 14일째에는 3과 5%의 D타입 프로폴리스군에서 콜라겐이 형성이 유의성 있게 증가하여 창상이 치유되는 시간에 따라 각각 다른 종류의 프로폴리스군이 콜라겐의 형성에 영향을 미치는 것으로 보여졌다 (Fig. 2). 반면 창상의 width와 depth 변화를 측정한 결과에서는 콜라겐의 형성에 큰 영향을 미치지 않은 C타입의 프로폴리스군에서 긍정적인 효과를 확인하여 (Fig. 3) 창상 부위에서의 성장인자, 콜라겐 및 전구물질의 농도 차이에 통계적인 유의성이 있더라도 과연 그것이 최종적인 창상의 강도를 결정하는데 어떤 역할을 하는가에 대해서는 결론을 내리기가 어렵다. 그리고 실제 연구에서도 콜라겐 농도의 차이가 있더라도 창상의 강도에 별 영향을 미치지 못하거나 오히려 콜라겐의 양을 증가시킨다는 보도도 있으며 초기에는 약간의 강도 차이가 있으나 어느 정도 시간이 경과하여 창상 조직이 성숙된 이후에는 조직 강도의 차이가 없다고 하였다 (Solheim et al., 1986).

결론적으로 프로폴리스는 대조군에 비해 콜라겐 생성을 증가시켜 창상 치유를 촉진시키는 것으로 보여지며 이때 상처 치유에 대한 효과는 Artepillin C를 비롯한 플라보노이드와 caffeate 성분들 같은 다양한 성분들의 복합적 작용에 기인한 결과로 사료된다.

위와 같은 결과들을 고려해 볼 때, 창상들에 프로폴리스를 크림 타입으로 개발해 적용할 경우 항균 작용 이외에 상처 치유 작용에 도움을 줄 것으로 기대되며 임상적으로 유용하게 응용될 수 있으리라 기대되는 바이며 이에 대한 분자 생물학 수준의 기전들이 뒷받침 되어야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 단국대학교 의학레이저 의료기기 지역혁신 센터의 지원에 의해서 이루어진 것임.

REFERENCES

- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherland and China. *J Ethnopharmacol.* 2000. 72: 239-246.
- Cho HC, Han JH, Kim JK, Hong Y. The effect of propolis (WEP) and vitamin E, C intake on fatigue variable, scavenging of free radical and reducing of peroxide induce by exercise. *Korean J Phys Educ.* 2006. 45: 687-697.
- Dvivedi S, Tiwari SM, Sharma A. Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. *Indian J Exp Biol.* 1997. 35: 1243-1245.
- Fujii K, Tajiri K, Kajiwara T, Tanaka T, Murota K. Effects of NSAID on collagen and proteoglycan synthesis of cultured chondrocytes. *J Rheumatol Suppl.* 1989. 18: 28-31.
- Han ZZ, Kim JY, Park DH, Kim NH, Hwang JY, Xu HD, Wie MB, Jung BD, Kwon MS. Protective effects of water extracted propolis on CCl4-induced acute hepatotoxicity in mice. *Korean J Lab Animal Sci.* 2003. 19: 45-51.
- Haws MJ, Kucan JO, Roth AC, Suchy H, Brown RE. The effects of chronic ketorolac tromethanmine (toradol) on wound healing. *Ann Plast Surg.* 1996. 37: 147-151.
- Hur YK, Kim NR, Yoon WK, Jo SK, Jung UH, Park HR. Properties of Korean propolis on the antibacterial activity and inhibition of antibiotic-resistant bacteria. *Korean J Apiculture* 2007. 22: 71-78.
- Kim JE, Shin HW, Ro YS. A case of allergic contact dermatitis to propolis on the lips and oral mucosa. *Korean J Dermatol.* 2009. 47: 199-202.
- Kim JY, Yoo BS. Protective effects of propolis on UVC-induced cell death of CHO cells. *Korean J Apiculture* 2008. 23: 63-67.
- Kim NM, Koo BS, Lee SG, Hwang EI, So SH, Do JH. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res.* 2007. 31: 86-92.
- Kim SH, Jeon JS. The study on wound healing in rabbit skins by low-intensity laser irradiation. *Korean J Biomed Lab Sci.* 2000. 6: 119-129.
- Kimoto T, Koya S, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, kurimoto M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Pathol Int.* 2000. 50: 679-689.
- Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G, Shani J, Mos M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J Ethnopharmacol.* 1996. 55: 19-25.
- Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001. 74: 105-112.
- Margaret I, Jamil K. Influence of naproxen on the healing of open excision wound in rats. *Biomed Sci Instrum.* 1997. 33: 226-232.
- Mauviel A, Kahari VM, Heino J, Daireaux M, Hartmann DJ, Loyau G, Pujol JP. Gene expression of fibroblast matrix proteins is altered by indomethacin. *FEBS Lett.* 1988. 231: 125-129.
- Miltyk W, Karna E, Palka J. Inhibition of prolidase activity by nonsteroid anti-inflammatory drugs in cultured human skin fibroblasts. *Pol J Pharmacol.* 1996. 48: 609-613.
- Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* 1983. 9: 163.
- Munstedt K. Propolis, current and future medical uses. *American Bee J.* 2001. 141: 506-507.
- Nardini M, Natella F, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. *Arch Biochem Biophys.* 1997. 342: 157-160.

- Pilbeam CC, Fall PM, Alander CB, Raisz LG. Differential effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. *J Bone Miner Res.* 1997. 12: 1198-1203.
- Rhim JY, Moon YS, Jung SH, Lee KY, Lyu SY, Shim CS, Park WB. Antimicrobial activities of combined extract of Aloe vera with propolis against oral pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2002. 31: 899-904.
- Solheim LF, Ronningen H, Barth E, Langeland N. Effects of acetylsalicylic acid and naproxen on the mechanical and biochemical properties of intact skin in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1986. 20: 161-163.
- Son YR. Studies on the antimicrobial effect of extracts of propolis. *J Food Hyg Safety* 2003. 18: 189-194.
- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993. 329: 21-24.
-