

# Działanie przeciwnowotworowe ekstraktów propolisowych

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Szychalski

## ANTICANCER ACTIVITY OF EXTRACTS FROM PROPOLIS

### SUMMARY

The literature reviews show that the propolis extracts demonstrate the significant cytotoxic activity against many lines of animal tumor cells also human tumor cells. It has been documented by *in vitro* and *in vivo* studies.

The carried out studies show, that the main mechanism of activity of propolis extracts on cancer cells is the induction of apoptosis process (programmed cell death).

**KEY WORDS:** PROPOLIS EXTRACTS – ANTICANCER ACTIVITY – CYTOTOXIC ACTIVITY – CANCER CELLS LINES – MECHANISM OF ACTIVITY

Działanie przeciwnowotworowe propolisu datuje się od połowy lat 60. ubiegłego stulecia. Jako pierwsi cytostatyczne właściwości ekstraktu etanolowego z propolisu stwierdzili badacze rumuńscy Derevici i Popescu (1) w połowie lat 60. ubiegłego wieku. Odnotali oni, że ekstrakt ten hamował rozwój nowotworu puchliny wodnej Ehrlicha u szczurów.

W dziesięć lat później spostrzeżenia te zostały potwierdzone w trakcie leczenia nowotworów u zwierząt doświadczalnych przez naukowców litewskich Valaviczju i wsp. (2).

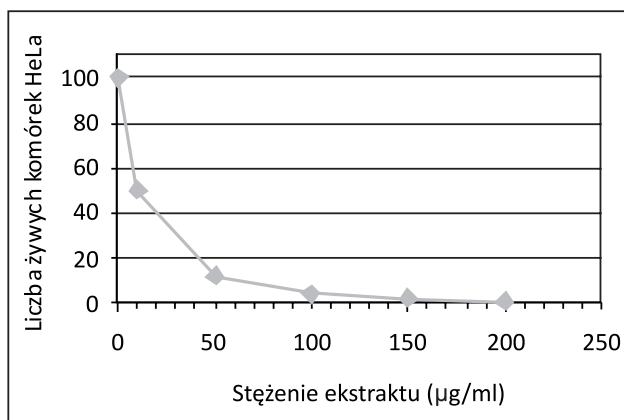
Duże zasługi w tym zakresie mają badacze polscy. Hladoń i wsp. (3) wykazali działanie ekstraktów z propolisu krajowego na hodowle komórkowe nowotworów ludzkich HeLa i KB (tab. 1). Najwyższą aktywność cytostatyczną ED<sub>50</sub> (stężenie hamujące w 50% biosyntezę białek w hodowlach tych nowotworów) wykazywał ekstrakt eterowy z propolisu w odniesieniu do hodowli tkankowej nowotworu HeLa (ED<sub>50</sub> = 3,9 µg/ml). Jeszcze większą aktywnością cytostatyczną odznaczały się frakcja butanolowa i frakcja octanu etylowego, które otrzymano z ekstraktu eterowego. Ich ED<sub>50</sub> wobec hodowli komórkowej nowotworu HeLa wynosiły odpowiednio 2,6 i 3,3 µg/ml, a wobec hodowli nowotworu KB odpowiednio 2,9 i 3,4 µg/ml. Dla porównania ED<sub>50</sub> dla substancji standardowej, jaką jest arabinozyd cytozyny, wynosiło 0,89 µg/ml.

**Tabela 1.** Działanie cytotoksyczne ekstraktów z propolisu polskiego na hodowle tkankowe nowotworów (3).

Ekstrakty propolisowe	Hodowle tkankowe nowotworów (ED <sub>50</sub> )*	
	HeLa (µg/ml)	KB (µg/ml)
Ekstrakt eteru naftowego	510,0	–
Ekstrakt chloroformowy	200,0	–
Ekstrakt metanolowy	580,0	–
Ekstrakt wodny	> 1000,0	–
Ekstrakt eterowy (EE)	3,9	–
Frakcja chloroformowa z EE	4,6	4,8
Frakcja octanu etylowego z EE	3,3	3,4
Frakcja butanolowa z EE	2,6	2,9
Frakcja etanolowa z EE	13,2	12,1
Arabinozyd cytozyny (standard)	0,89	–

\*ED<sub>50</sub> – Stężenie ekstraktu (µg/ml) hamujące w 50% biosyntezę białek w hodowli tkankowej nowotworu

Ban i wsp. (4), naukowcy serbscy, odnotowali wysoką aktywność ekstraktu etanolowego z propolisu krajowego. Stwierdzili oni, że ED<sub>50</sub> ekstraktu w odniesieniu do hodowli komórek nowotworowych HeLa wynosi 10 µg/ml (ryc. 1). Ponadto po 24 godz. ekstrakt ten odznaczał się wysoką aktywnością przeciwnowotworową nie tylko wobec komórek znajdujących się w trakcie namnażania, ale także będących w fazie spoczynkowej.



**Ryc. 1.** Działanie ekstraktu etanolowego z propolisu serbskiego na hodowlę tkankową komórek nowotworowych HeLa (4).

Następnie Baśić i wsp. (5) badali u myszy działanie ekstraktu wodnego z propolisu chorwackiego w kontekście zapobiegania przerzutom do płuc przeszczepialnego nowotworu piersi (TBK) o słabej immunogenności. Zarówno komórki przeszczepialne nowotworu w liczbie  $10^3$ /zwierzę, jak i ekstrakt propolisowy w ilości 0,5 mg/kg podawano drogą dożylną. Zauważono, że podanie ekstraktu propolisowego na 7 dni przed zakażeniem powodowało znaczne zmniejszenie przerzutów nowotworu do płuc, natomiast jeśli zakażenie zwierząt wykonywano równocześnie z podaniem ekstraktu lub ekstrakt podawano po 7 dniach od zakażenia, nie miało to wpływu na liczbę przerzutów do płuc.

Banskota i wsp. (6) zajęli się działaniem ekstraktów otrzymanych z propolisu brazylijskiego na hodowle komórkowe nowotworu włókniakomięsaka ludzkiego HT-1080 i nowotworu mysiego okrężnicy L5-26. Ekstrakty z propolisu otrzymywano w następujący sposób: najpierw surowiec ekstrahowano wodą, następnie pozostałość ekstrahowano kolejno alkoholem metylowym i chloroformem. Ekstrakt metanolowy frakcjonowano z kolei za pomocą octanu etylu na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną w tym rozpuszczalniku. Cytotoksyczność otrzymanych ekstraktów podano w tabeli 2. Otrzymane wyniki wskazują, że ekstrakt wodny nie odznaczał się działaniem cytotoksycznym ( $ED_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ ). Natomiast pozostałe ekstrakty i frakcje działały na hodowle komórkowe badanych nowotworów w granicach  $ED_{50}$  od 53,1 do 89,6  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabela 2.** Działanie cytotoksyczne ekstraktów z propolisu brazylijskiego na hodowle komórkowe nowotworów (6).

Ekstrakty propolisowe	Hodowle komórkowe nowotworów ( $ED_{50}$ )	
	HT-1080 ( $\mu\text{g/ml}$ )	L5-26 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ekstrakt wodny	>100,0	>100,0
Ekstrakt metanolowy	67,3	62,4
Ekstrakt chloroformowy	73,1	100,0
Fracja octanu etylu rozpuszczalna	53,1	50,7
Fracja octanu etylu nierozpuszczalna	89,6	84,6

Ci sami autorzy (7) przebadali ekstrakty metanolowe, otrzymywane podobnie jak opisano powyżej, pochodzące z Brazylii, Peru, Chin i Holandii (tab. 3). Badania wykazały, że ekstrakty metanolowe z Chin i Holandii odznaczały się stosunkowo silnym działaniem cytotoksycznym wobec badanych hodowli komórek nowotworowych ( $ED_{50} = 3,5$  i  $3,9 \mu\text{g/ml}$ ) w porównaniu do ekstraktów propolisowych pochodzących z Brazylii i Peru ( $ED_{50} = 12,5$  i  $65,5 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabela 3.** Działanie cytotoksyczne ekstraktów metanolowych z propolisu pochodzących z różnych rejonów geograficznych na hodowle komórkowe nowotworów (7).

Pochodzenie ekstraktów metanolowych z propolisu	Liczba prób	Hodowle komórkowe nowotworów ( $ED_{50}$ )	
		HT-1080 ( $\mu\text{g/ml}$ )	L5-26 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Brazylia	6	14-3-56,4	12,5-65,5
Peru	1	51,1	76,4
Chiny	1	3,9	N
Holandia	1	3,5	N
N – Nie badano			

Kimoto i wsp. (8) wywoływali nowotwory nerek u myszy za pomocą nitrylotriocjanu żelazowego i leczyli je równocześnie za pomocą ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego. Zwierzęta otrzymywały dootrzewnowo wymieniony karcynogen w ilości 10 mg/dzień 2 razy w tygodniu przez 8 tygodni. Równocześnie otrzymywały one ekstrakt etanolowy z propolisu brazylijskiego w postaci 1% roztworu etanolowego dodawanego do wody do picia przez 5 tygodni. Zwierzęta kontrolne otrzymywały do picia 1% wodny roztwór etanolu. Zwierzęta, które przeżyły warunki doświadczenia, uśmiercano po roku od ostatniego podania roztworu propolisu i ich nerki badano histopatologicznie. Wyniki badań zamieszczone w tabeli 4 wskazują na wyraźne ochronne działanie ekstraktu propolisowego, zabezpieczające przed rozwojem nowotworu nerek. U zwierząt tych obserwowano co prawda powstawanie łagodnych torbieli, ale w żadnym przypadku nie przeistaczały się one w torbiele o charakterze przedrakowym, a następnie w formy nowotworowe, jak to miało miejsce u części zwierząt grupy nieleczonej.

Badania kontynuowano z wywoływaniem nowotworu płuc u myszy za pomocą nitrylotriocjanu żelazowego i leczeniem zwierząt ekstraktem propolisu brazylijskiego (9). Wyniki badań zebrane w tabeli 5 dowodzą, że i w tym przypadku 1% roztwór etanolowy tego ekstraktu dodawany do wody do picia zwierzętom doświadczalnym w pełni zabezpieczał je przed powstaniem gruczolakoraka płuc w 50% przypadków.

Ekstrakt wodny z propolisu izraelskiego odznaczał się zdolnością hamowania przemiany komórek nowotworu NIH/3T3 w formę złośliwą pod wpływem wirusa raka mysiego Moloney MuSV-124 (10). Ekstrakt propolisowy działał najbardziej skutecznie, jeśli podawano go zwierzętom na 2 godz. przed zakażeniem wirusem lub w trakcie zakażenia. Kiedy leczenie ekstraktem propolisowym kontynuowano przez 5-10 dni po zakażeniu, przemiana komórek nowotworowych w formę złośliwą cofała się całkowicie, a wirus MuSV-124 stał się niechorobotwórczy. Przeprowadzone badania

**Tabela 4.** Działanie ochronne ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego przed rozwojem nowotworu nerek u myszy (8).

Podawane substancje	Liczba zwierząt		Rozwój nowotworu nerek		
	poddanych badaniu	przeżywających	torbiel łagodna	torbiel przedrakowa	nowotwór nerek
Etanol 1% (kontrola)	12	8	5	3	4
Ekstrakt etanolowy z propolisu – 1% roztwór etanolowy	12	9	9	0	0

**Tabela 5.** Działanie ochronne ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego przed rozwojem nowotworu płuc u myszy (9).

Podawane substancje	Liczba zwierząt		Rozwój nowotworu płuc	
	poddanych badaniu	przeżywających	gruczolak	gruczolakorak
Etanol 1% (kontrola)	12	8	1	4
Ekstrakt etanolowy z propolisu – 1% roztwór etanolowy	12	9	1	0

wskazują, że ekstrakt wodny z propolisu izraelskiego hamuje późniejszy stopień zakażenia wirusem, kiedy przenika on do genomu gospodarza. Świadczy o tym fakt, że ekstrakt propolisowy podany zwierzętom po zakażeniu ich wirusem także wyraźnie hamuje przemianę komórek nowotworu w formę złośliwą.

Z kolei Borelli i wsp. (11) oraz Bazo i wsp. (12) próbowali leczyć za pomocą ekstraktów etanolowych z propolisu nadżerki okrężnicy u szczurów o charakterze nowotworowym wywołane za pomocą substancji karcynogennych, takich jak azoksymetan i 1,2-dimetylohydrazyna. W pierwszym przypadku podawanie ekstraktu etanolowego w ilości 500 mg/kg m.c. drogą pokarmową nie przyniosło żadnych rezultatów, natomiast w drugim przypadku podawanie ekstraktu etanolowego z propolisu w ilości 30 mg/kg m.c. drogą jelitową obniżało zaledwie powstawanie nadżerek okrężnicy o ok. 8% w porównaniu do kontroli.

Badania Banskoty i wsp. (13) wykazały, że ekstrakt metanolowy z propolisu holenderskiego hamował proliferację (namnażanie) wysoce złośliwego i dającego przerzuty do wątroby nowotworu mysiego okrężnicy LP-26 w warunkach *in vitro*.  $EC_{50}$  tego ekstraktu wobec hodowli komórkowej nowotworu LP-26 wynosiło 3,5  $\mu$ g/ml.

Oršolić i Bašić (14) oceniali działanie ochronne ekstraktu wodnego z propolisu chorwackiego i brazylijskiego przed przerzutami do płuc wszczepialnego raka gruczołu sutkowego (MCA) u myszy. Komórki nowotworowe podawano myszom drogą dożylną w liczbie 200 000/zwierzę. Ekstrakty wodne z propolisu podawano w ilości 50 i 150 mg/kg m.c. na 15, 10 i 5 dni przed zakażeniem. Następnie po 3 tygodniach od zakażenia zwierzęta uśmiercano i określano w ich płucach liczbę guzków nowotworowych. Badania

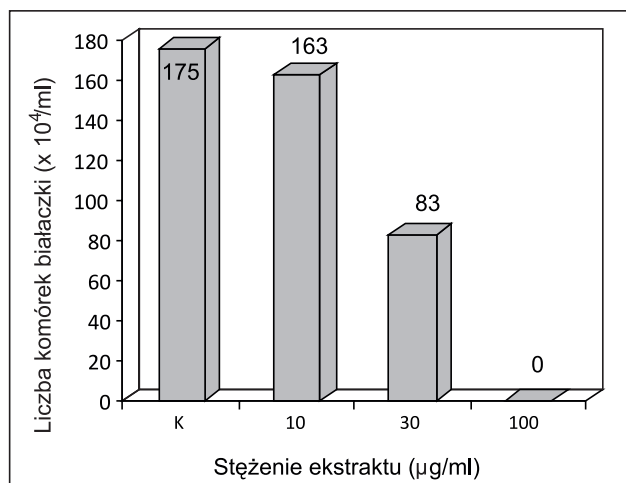
wykazały (tab. 6), że zarówno ekstrakt wodny otrzymany z propolisu chorwackiego, jak i brazylijskiego ochraniały zwierzęta przed przerzutami komórek nowotworowych do płuc. W przypadku mniejszej dawki ekstraktu chorwackiego przerzuty do płuc wszczepionego nowotworu były mniejsze o ok. 70%, a w przypadku ekstraktu brazylijskiego mniejsze o ok. 60% w porównaniu do kontroli. Wyższa dawka zabezpieczała zwierzęta przed przerzutami nowotworowymi odpowiednio w 78 i 70%.

**Tabela 6.** Działanie ochronne ekstraktu wodnego z propolisu chorwackiego i brazylijskiego przed przerzutami do płuc wszczepialnego raka gruczołu sutkowego u myszy (14).

Rodzaj ekstraktu z propolisu	Dawka ekstraktu (mg/kg m.c.)	Przerzuty nowotworu do płuc zakażonych myszy (liczba przerzutów/płuca)
Kontrola	–	62,7
Ekstrakt chorwacki	50	18,7
	150	13,8
Ekstrakt brazylijski	50	25,3
	150	13,0

W związku z powyższym autorzy dowodzą, że mechanizm ochrony zwierząt przed przerzutami nowotworu MCA do płuc pod wpływem ekstraktów propolisowych polega na wzroście ich aktywności immunostymulującej. Świadczą o tym m.in. badania wskazujące, że ekstrakty wodne z propolisu chorwackiego i brazylijskiego powodują w limfocytach śledzionowych wzrost cząsteczek CD4 i CD8 odpowiednio o 24 i 113% oraz przyspieszają apoptozę komórek nowotworowych o ok. 22% w porównaniu do zwierząt zakażonych nowotworem i nieotrzymujących ekstraktów propolisowych.

Podobne efekty otrzymali Aso i wsp. (15) na drodze działania ekstraktu wodnego z propolisu brazylijskiego w warunkach *in vitro* na hodowlę komórek nowotworu białaczki ludzkiej U937. Wyniki badań zilustrowane na rycinie 2 wskazują, że po 5 dniach inkubacji ekstrakt propolisowy w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  hamował rozwój komórek tego nowotworu w 100%. Niższe stężenia działały słabiej. W równoległe prowadzonych badaniach stwierdzono, że ekstrakt wodny z propolisu brazylijskiego w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  hamował w 90,5% syntezę DNA, w 71,4% syntezę RNA i w 34,5% syntezę białek w komórkach nowotworowych. Ponadto stwierdzono, że ekstrakt ten w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  odznaczał się wysoką cytotoxycnością (82,7%) oraz w dużym stopniu wzmacniał apoptozę komórek nowotworowych (o 41% w porównaniu do komórek niepoddawanych działaniu propolisu).

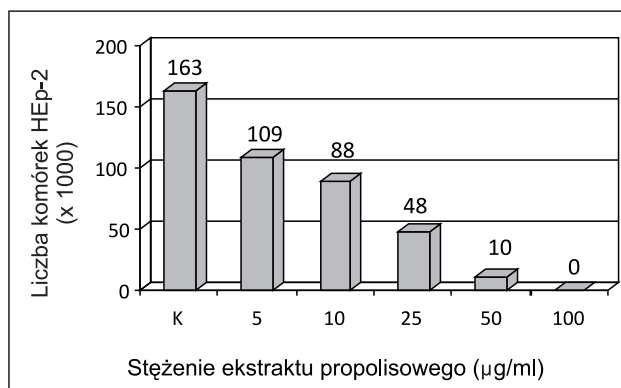


Ryc. 2. Hamowanie rozwoju hodowli komórek nowotworu białaczki ludzkiej U937 pod wpływem ekstraktu wodnego propolisu brazylijskiego po 5 dniach inkubacji w warunkach *in vitro* (15).

Alencar i wsp. (16) dla ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego określili aktywność cytotoxyczną ( $\text{IC}_{50}$ ) wobec komórek nowotworowych HeLa na poziomie 7,45  $\mu\text{g/ml}$ .

Badania Būfalo i wsp. (17) przeprowadzone z udziałem ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego wykazały, że w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  hamuje on całkowicie rozwój hodowli powierzchniowego krtaniowego raka ludzkiego HEP-2 po 24 godz. ekspozycji w warunkach *in vitro* (ryc. 3). Niższe stężenia ekstraktu propolisowego wykazywały słabsze działanie cytotoxyczne.

Inoue i wsp. (18) oceniali działanie ekstraktu wodnego z propolisu japońskiego na przeszczepialny mięsak myszy U-180. Hodowlę mięsaka wszczepiano myszom w podskórną tkankę lewego uda w ilości



Ryc. 3. Działanie cytotoxyczne ekstraktu etanolowego z propolisu brazylijskiego na hodowlę komórek powierzchniowego krtaniowego raka ludzkiego HEP-2 po 24-godzinnej ekspozycji w warunkach *in vitro* (17).

4 $\cdot$ 10<sup>6</sup> komórek/mysz. Ekstrakt propolisowy podawano zwierzętom sondą do żołądka w dawce 320  $\mu\text{g/ml}$  (10 mg/mysz) i 960  $\mu\text{g/ml}$  (30 mg/mysz) 5 razy dziennie po upływie 24 godz. od wszczępienia nowotworu. Badania prowadzono przez 10 dni, a następnie określano u zwierząt masę powstałego nowotworu oraz liczbę komórek mitotycznych w tkance nowotworowej w polu widzenia preparatu mikroskopowego. Stwierdzono, że pod wpływem leczenia zwierząt ekstraktem propolisowym masa powstałego mięsaka w miejscu wszczępienia komórek nowotworowych wynosiła w przypadku mniejszej dawki zaledwie ok. 16%, a w przypadku wyższej dawki ok. 8% masy mięsaka powstałego u zwierząt kontrolnych (nieleczonych) (tab. 7). Liczba komórek mitotycznych (zdolnych do podziału) w zmianach nowotworowych u zwierząt leczonych ekstraktem propolisowym była także odpowiednio niższa (tylko o ok. 18 i 14%) w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki te wskazują na wyraźne działanie przeciwnowotworowe ekstraktu wodnego z propolisu japońskiego w odniesieniu do wszczępielnego mięsaka mysiego S-180.

Tabela 7. Działanie ekstraktu wodnego z propolisu japońskiego podawanego drogą jelitową na przeszczepione do organizmu myszy komórki mięsaka mysiego S-180 (18).

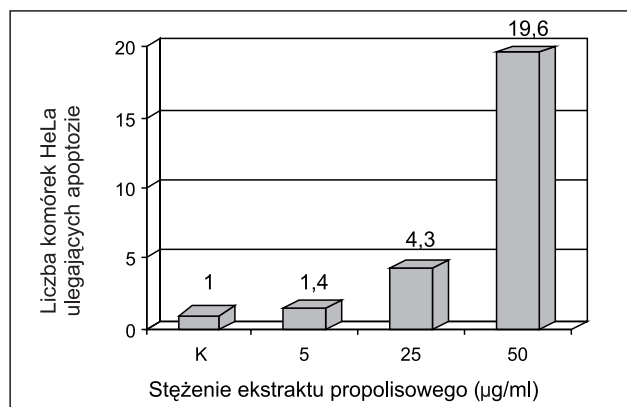
Dawki ekstraktu propolisowego	Masa powstałego mięsaka (mg)		Liczba komórek mitotycznych	
	wartość	procent	wartość	procent
Kontrola	701*	100,0	12,25*	100,0
Ekstrakt 320	74	15,5	2,25	18,4
960	53	7,6	1,75	14,3

\*Średnie dla 8 zwierząt

Interesujące badania przeprowadzili Szliszka i wsp. (19) nad apoptozą (nagłą śmiercią) komórek nowotworowych HeLa pod wpływem ekstraktu etanolowego z propolisu polskiego (EEP). Okazało się,



że EEP wzmacniał apoptozę komórek HeLa (ryc. 4). Po 48 godz. ekspozycji komórek HeLa w warunkach *in vitro* w obecności 50  $\mu\text{g/ml}$  EEP ich apoptoza wzrosła o 19,6% w porównaniu do kontroli (bez ekstraktu propolisowego).



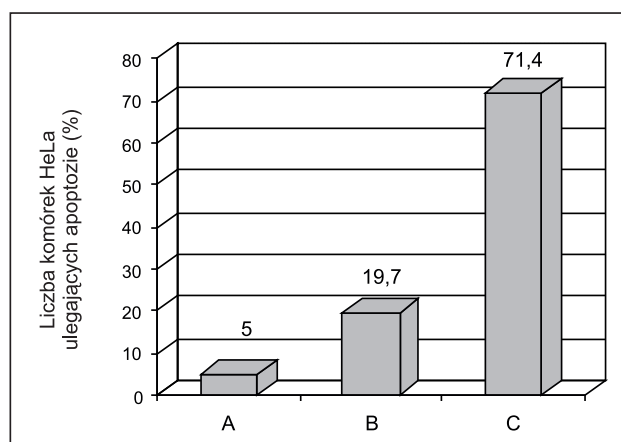
Ryc. 4. Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu polskiego na apoptozę komórek nowotworowych HeLa po 48 godz. ekspozycji w warunkach *in vitro* (19).

Ponadto wymienieni autorzy stwierdzili, że apoptozę komórek nowotworowych HeLa w obecności EEP znacznie podwyższa czynnik TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Należy on do grupy czynników TNF (czynnik martwicy nowotworu) i indukuje apoptozę komórek nowotworowych, nie wpływając przy tym na normalne komórki organizmów żywych. Wyniki badań zilustrowane na rycinie 5 wskazują, że sam czynnik TRAIL powoduje apoptozę komórek HeLa na poziomie 5%, EEP na poziomie 19,7%, a łącznie czynnik TRAIL i EEP powodują apoptozę komórek HeLa na poziomie 71,4% przy zastosowanych stężeniach tych substancji. Badania te w jakimś stopniu wyjaśniają mechanizm działania przeciwnowotworowego ekstraktów propolisowych. Autorzy (19) sądzą, że ma to związek z receptorami śmierci komórek – TRAIL-R1 i TRAIL-R2, które odpo-

wiedzialne są m.in. za indukcję apoptozy komórek nowotworowych.

Li i wsp. (20) badali wpływ ekstraktu metanolowego z propolisu birmańskiego na komórki ludzkiego nowotworu trzustki PANC-1 i stwierdzili, że jego cytotoksyczność wyrażona w postaci wartości  $\text{IC}_{50}$  wynosi 9,3  $\mu\text{g/ml}$ .

Na podstawie badań Vatansevera i wsp. (21) możemy przyjąć, że ekstrakty etanolowe z propolisu tureckiego odznaczały się aktywnością cytotoksyczną, wzmacniały apoptozę komórek ludzkiego nowotworu sutka MCF-7 oraz podwyższały aktywność kaspazy 8, biorącej udział w procesie apoptozy (tab. 8). Przedstawione wyniki badań wskazują jednoznacznie, że wysokiej cytotoksyczności ekstraktów propolisowych odpowiadał wysoki stopień apoptozy komórek nowotworowych i wysoka aktywność kaspazy 8 (próbki 5 i 6) w porównaniu do ekstraktów propolisowych o niskiej cytotoksyczności, stopniu apoptozy i aktywności kaspazy 8 (próbki 3 i 7) (tab. 8). Autorzy dowodzą, że działanie przeciwnowotworowe propolisu polega



Ryc. 5. Wpływ czynnika TRAIL i ekstraktu etanolowego z propolisu polskiego (EEP) na apoptozę komórek nowotworowych HeLa po 48 godz. ekspozycji w warunkach *in vitro* (19).

A – TRAIL 100  $\mu\text{g/ml}$ , B – EEP 50  $\mu\text{g/ml}$ , C – TRAIL 100  $\mu\text{g/ml}$  + EEP 50  $\mu\text{g/ml}$

Tabela 8. Działanie ekstraktów etanolowych z propolisu tureckiego na hodowlę komórkową ludzkiego nowotworu piersi MCF-7 w kontekście aktywności cytotoksycznej, wzmacniania apoptozy i aktywności enzymu kaspazy 8 (21).

Badane ekstrakty propolisowe (PE)	Działanie ekstraktów propolisowych w stężeniach 125 $\mu\text{g/ml}$		
	cytotoksyczność <sup>1</sup>	apoptoza (%) <sup>2</sup>	kaspaza 8 <sup>3</sup>
1	0,121	51,1	++
2	0,119	26,4	++
3	0,109	17,1	+
4	0,110	63,3	++
5	0,134	89,5	+++
6	0,150	98,0	+++
7	0,100	28,9	+

<sup>1</sup>Oznaczenie chemiczne z udziałem związku tetrazoliowego; absorbcja barwnego kompleksu z żywymi komórkami nowotworowymi.

<sup>2</sup>Liczba komórek nowotworowych nieczynnych na drodze apoptozy, w procentach.

<sup>3</sup>Aktywność oceniana na podstawie immunochemicznego wiązania przeciwciał skierowanych przeciwko kaspazie 8.

między innymi na wzmaganiu apoptozy komórek pod wpływem swoistych enzymów, jakimi są kaspazy.

Chen i wsp. (22) badali cytotoksyczność ekstraktów etanolowych z propolisu tajwańskiego wobec komórek czerniaka ludzkiego i stwierdzili, że odznacza się ona dość wysokimi wartościami  $IC_{50}$  (tab. 9). Dla większości badanych ekstraktów propolisowych wartość  $IC_{50}$  mieściła się w granicach 2,0-5,0  $\mu\text{g/ml}$ . Natomiast stężenia ekstraktów unieczynnijące ponad 95% komórek czerniaka ludzkiego wynosiły od 5,0 do 10,0  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabela 9.** Aktywność cytotoksyczna ekstraktów etanolowych z propolisu tajwańskiego wobec komórek czerniaka ludzkiego w warunkach *in vitro* (22).

Badane ekstrakty propolisowe	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Stężenie ekstraktu unieczynnijące ponad 95% komórek nowotworowych ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	2,3	5,0
2	20,0	40,0
3	9,5	20,0
4	2,0	5,0
5	3,3	5,0
6	5,0	10,0
7	7,0	10,0
8	3,2	5,0

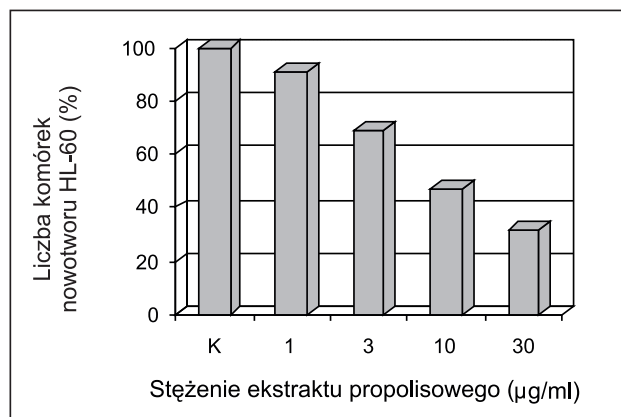
Ishihara i wsp. (23) oceniali aktywność cytotoksyczną ekstraktów etanolowych otrzymanych z propolisu chińskiego i brazylijskiego na 4 linie komórkowe nowotworów ludzkich okrężnicy w warunkach *in vitro*. Badania przedstawione w tabeli 10 wskazują, że ekstrakt z propolisu chińskiego działał nieco silniej cytotoksycznie w porównaniu do ekstraktu z propolisu brazylijskiego. Wartość  $IC_{50}$  oraz liczba żywych komórek nowotworu SW480 były najniższe w porównaniu do pozostałych linii komórek nowotworowych. Wartość  $IC_{50}$  dla ekstraktu z propolisu chińskiego wynosiła 4,4  $\mu\text{g/ml}$ , a dla ekstraktu z propolisu brazylijskiego 32,5  $\mu\text{g/ml}$ . Natomiast w obecności ekstraktu z propolisu chińskiego w stężeniu 40  $\mu\text{g/ml}$  po 72 godz. przeżywało 28,1% komórek tego nowotworu, a w obecności ekstraktu z propolisu brazylijskiego przeżywało w tych warunkach 41,1% komórek nowotworu SW480. Pozostałe linie komórek nowotworów ludzkich okrężnicy były mniej wrażliwe na działanie obu badanych ekstraktów propolisowych.

**Tabela 10.** Aktywność cytotoksyczna ekstraktów etanolowych z propolisu chińskiego i brazylijskiego na 4 linie komórkowe nowotworów ludzkich okrężnicy w warunkach *in vitro* (23).

Linie komórkowe nowotworów	Ekstrakt z propolisu chińskiego		Ekstrakt z propolisu brazylijskiego	
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	liczba żywych komórek (%) <sup>1</sup>	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	liczba żywych komórek (%) <sup>1</sup>
CaCo2	> 50,0	57,9	> 50,0	83,9
HT29	19,0	31,6	38,9	46,2
HCT116	12,2	28,1	41,0	48,2
SW480	4,4	22,8	32,5	41,1

<sup>1</sup>Badania prowadzono w obecności 40  $\mu\text{g/ml}$  ekstraktu propolisowego przez 72 godziny.

Eom i wsp. (24) określali wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu koreańskiego na komórki nowotworowe białaczki ludzkiej HL-60. Cytotoksyczne działanie tego ekstraktu na komórki nowotworowe przedstawiono na ryc. 6. Wykazano, że w miarę zwiększania stężenia ekstraktu propolisowego liczba żywych komórek nowotworowych malała i po 4 godz. działania 30  $\mu\text{g/ml}$  ekstraktu ich liczba była o ok. 70% niższa w porównaniu do hodowli wyjściowej.



**Ryc. 6.** Cytotoksyczne działanie ekstraktu etanolowego z propolisu koreańskiego na komórki nowotworowe białaczki ludzkiej HL-60 przez okres 4 godz. w warunkach *in vitro* (24).

W trakcie wyjaśniania mechanizmu działania ekstraktu etanolowego z propolisu na komórki HL-60 stwierdzono, że proces ten jest wynikiem apoptozy komórek. Badania wykazały, że ekstrakt propolisowy powodował fragmentację DNA oraz wzmagał aktywność kaspazy 3 biorącej udział w apoptozie komórek nowotworowych. Z tabeli 11 wynika, że pod wpływem ekstraktu propolisowego w stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$  poziom fragmentacji DNA komórkowego wynosił ok. 73% w odniesieniu do kontroli, a aktywność kaspazy 3 była prawie 3-krotnie wyższa w porównaniu do kontroli. Poza tym obserwowano uwalnianie pod wpływem ekstraktu propolisowego cytochromu C z mitochondriów do cytoplazmy, co wskazywało na to, że wzmaganie apoptozy komórek nowotworowych zachodzi na drodze mitochondrialnej.

**Tabela 11.** Zmiany biochemiczne w komórkach nowotworowych białaczki limfatycznej HL-60 pod wpływem ekstraktu etanolowego z propolisu koreańskiego (24).

Stężenie ekstraktu propolisowego (µg/ml)	Zmiany biochemiczne	
	fragmentacja DNA (%)	aktywność kaspazy 3 <sup>1</sup>
K	19,3	1,00
1	34,2	1,05
3	39,5	1,15
10	54,4	1,70
30	62,3	2,47
50	72,8	3,57

<sup>1</sup>Wielokrotność w odniesieniu do kontroli.

Z powyższego przeglądu piśmiennictwa wynika, że ekstrakty propolisowe odznaczają się dość znaczną aktywnością cytotoksyczną wobec wielu linii komórek nowotworów zwierzęcych i ludzkich, co udowodniono na drodze badań prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Przeprowadzone badania wskazują, że głównym mechanizmem działania ekstraktów propolisowych na komórki nowotworowe jest wywołanie u nich procesu apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórek).

#### Piśmiennictwo

1. Derevici A, Popescu A. Azione *in vitro* del propolis sulle cellule del tumore ascitico di Ehrlich. Riv Vet 1966; 15:175-182; wg Apicult Abstr 471/71. 2. Valaviczju JM, Neszukajtene KS, Valaviezene JV i wsp. Etude experimentale de l'action des preparations provenant des abeilles sur l'organisme de rats porteurs de tumeurs. Liet. T.S.R. Mokslu Akad Darb C.S.S.S.R 1975; 3:105-10; wg BS 1976; 37:2995. 3. Hładoń B, Bylka W, Ellnain-Wojtaszek M i wsp. *In vitro* studies on the cytostatic activity of propolis extracts. Arzneimittel Forsch 1980; 30:1847-8. 4. Ban J, Popovic S, Maysinger D. Cytostatic effects of propolis *in vitro*. Acta Pharm Jugosl 1983; 33:254-5. 5. Bašić I, Čuvić S, Tadić Z i wsp. Antimetastase-Wirkung von Bienengift und wasserlöslichen Propolisderivaten bei Mäusen. Apimondia XXXIV Internationaler Bienenzüchterkongress, Lousanne 1995; 137-8. 6. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK i wsp. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. J Nat Prod 1998; 61:896-900. 7. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK i wsp. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherland and China. J Ethnopharmacol 2000;

72:239-46. 8. Kimoto T, Koya S, Hino K i wsp. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. Pathol Int 2000; 50:679-89. 9. Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K i wsp. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. Virchows Arch 2001; 438:259-70. 10. Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by Moloney murine sarcoma virus. Arch Virol 2001; 146:1517-26. 11. Borelli F, Izzo AA, di Carlo G i wsp. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. Fitoterapia 2002; 73 (Supp 1):S38-43. 12. Bazo AP, Marchesan-Rodrigues MA, Sforcin JM i wsp. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. Teratogen Carcinog Mutagen 2002; 22:183-94. 13. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY i wsp. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. J Ethnopharmacol 2002; 80:67-73. 14. Oršolić N, Bašić I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis; a factor of antitumor reactivity. J Ethnopharmacol 2003; 84:265-73. 15. Aso K, Kanno S-I, Tadano T i wsp. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. Biol Pharm Bull 2004; 27:727-30. 16. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML i wsp. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J Ethnopharmacol 2007; 113:278-83. 17. Būfalo MC, Candéias JM, Sforcin JM. *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEP-2) cells. Evid-Bas Compl Alter Med 2009; 6:483-7. 18. Inoue K, Saito M, Kanai i wsp. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *in vitro*. Am J Chin Med 2008; 36:625-34. 19. Szliszka E, Czuba ZP, Domino M i wsp. Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential TRAIL in cancer cells. Molecules 2009; 14:738-54. 20. Li F, Awale S, Zhang T i wsp. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. J Nat Prod 2009; 72:1283-7. 21. Vatansever HS, Sorkun K, Deliloğlu SI i wsp. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. Acta Histochem 2010; 112:546-56. 22. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L i wsp. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. Evid-Bas Compl Alter Med 2004; 1:175-85. 23. Ishihara M, Naoi K, Nashita M i wsp. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. Oncology Reports 2009; 22:249-54. 24. Eom HS, Lee EJ, Yoon BS i wsp. Propolis inhibits the proliferation of human leukemia HL-60 cells by inducing apoptosis through the mitochondrial pathway. Nat Prod Res 2010; 24:375-86.

otrzymano/received: 14.01.2011  
zaakceptowano/accepted: 22.01.2011

Adres/address:  
\*Bogdan Kędzia  
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich  
Zakład Farmakologii i Biologii Doświadczalnej  
ul. Libelta 27, 61-707 Poznań  
tel.: (61) 665-95-50, fax: 665-95-51  
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl