

Ocena właściwości cytotoksycznych etanolowego ekstraktu z propolisu w stosunku do komórek raka okrężnicy HCT 116

Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice
Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. n. med. Barbara Stawiarska-Pięta

EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF PROPOLIS IN HUMAN COLON CANCER CELL LINE HCT 116

SUMMARY

Numerous researches showed that propolis exhibits many healing properties. Not only has it antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, immunoprotective and hepatoprotective activities, but also anti-proliferative and cytotoxicity ones. The aim of this study was to evaluate total polyphenolic content and *in vitro* cytotoxic activity of ethanol extract of propolis depending on geographic location from where the propolis was derived and EEP concentrations used on HCT 116 colon cancer cells in *in vitro* tests.

Propolis samples were collected from different geographical locations in Poland. Propolis was characterized by polyphenolic content and flavonoids. A solution of ethanol extract of propolis in dimethyl sulfoxide was used as a material for the research. Ethanol from the extraction of propolis was removed by vaporization under vacuum. Cytotoxicity was evaluated by means of the MTT and LDH assays.

The cytotoxic effect of EEP at concentrations of 3.125-100 µg/ml after a 24-h incubation was from 1.11 % to 22.96% cell death. When EEP at concentration of 100 µg/ml was used, cytotoxicity amounted to 22.96%; 19.31% and 14.84% respectively for propolis from Kamianna, Łomża Landscape Park and Korbielów.

The results showed that in the case of the extract of propolis could inhibit cell growth of HCT 116 cell line. Ethanol extract of propolis from Poland obtained in the study exhibits cytotoxicity activity in colorectal carcinoma cells *in vitro*. MTT assay demonstrated that anti-proliferative properties of ethanol extract of propolis are dependent on the applied concentration and geographical locations.

KEY WORDS: CYTOTOXICITY – ETHANOL EXTRACT OF PROPOLIS – MTT – LDH – FOLIN'S COLORIMETRIC METHOD – COLORECTAL CANCER

Wstęp

Rosnące zainteresowanie niekonwencjonalnymi metodami leczenia wykorzystywanymi przez wieki sprawia, że propolis staje się coraz bardziej popularnym preparatem, stosowanym zarówno w leczeniu schorzeń miejscowych, jak i chorób wewnętrznych,

których leczenie tradycyjną farmakoterapią wydaje się być nieskuteczne. Bogactwo składu substancji biologicznie czynnych w produktach pszczelich spowodowało, że znalazły one zastosowanie w wielu specjalnościach medycyny, gdzie stosowanie ich przynosi wymierne korzyści. Przykładem może być leczenie ropnych zapaleń skóry, odleżyn, nadżerek, stanów zapalnych pochwy, stanów zapalnych górnych dróg oddechowych oraz owrzodzeń błony śluzowej górnego odcinka przewodu pokarmowego i wiele innych. Zastosowanie propolisu w leczeniu chorób wewnętrznych jest do dnia dzisiejszego niedoceniane. Pozytywne efekty leczenia uzyskano u osób z chorobami układu krążenia, układu oddechowego, układu pokarmowego, a także u chorych ze schorzeniami reumatycznymi.

Propolis jest jednym z najlepiej poznanych produktów pszczelich. Słowo propolis pochodzi z języka greckiego i oznacza w dosłownym tłumaczeniu „przedmurze miasta”. Propolis jest materiałem budulcowym, będącym spoiwem, służącym zarówno do przytwierdzenia plastra do ścian ramek, jak też naprawy wszelkich uszkodzeń ula. Pszczoły formują z kitu pszczelego rodzaj progu, przez który przechodzi każdy mieszkaniec ula. To swoiste „przedmurze” odpowiedzialne jest za ochronę przed wprowadzeniem bakterii oraz grzybów chorobotwórczych do wnętrza ula, gdzie znalazłyby one dogodne warunki do wzrostu, prowadząc do całkowitego wymarcia rodziny pszczelej.

Propolis jest bezpostaciową, żywicowatą, lepką substancją, produkowaną przez pszczoły, stanowiącą połączenie woskowej wydzieliny owadów z żywicą zebraną z roślin. Wykazuje on charakterystyczny cierpki, gorzki i piekący smak. Barwa propolisu jest różnorodna – od czarnej, brązowej, poprzez czerwoną, żółtą po zieloną. Skład chemiczny propolisu jest niezwykle złożony. Zawiera około 300 różnych substancji chemicznych. Polski propolis pochodzi przede wszystkim z pączków liściowych topoli czarnej

(*Populus nigra*), a także z brzozy (*Betula*) oraz olchy (*Alnus*) (1-3).

Liczne badania naukowe wykazały, że propolis wykazuje wiele cennych, leczniczych właściwości: działa przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo (4-6), przeciw pasożytniczo (7, 8), przeciwwirusowo (9), przeciwhepatotoksycznie (10), przeciwzapalnie (11), przeciwutleniająco (12), kardioochronnie (13), miejscowo znieczulająco (14), przeciw cukrzycowo (15), przeciwmurawianinowo (16). Coraz częściej także w literaturze fachowej można odnaleźć informacje na temat przeciwnowotworowego działania kitu pszczelego. Istotnym działaniem propolisu z tego punktu widzenia jest jego aktywność antyproliferacyjna, cytotoksyczna oraz proapoptotyczna w stosunku do komórek nowotworowych (17-19). Prowadzone badania eksperymentalne mają na celu potwierdzenie sposobu działania przeciwnowotworowego oraz poznanie jego dokładnego mechanizmu. Dziś wiadomo, że substancjami, którym przypisuje się działanie przeciwnowotworowe, są flawonoidy (głównie apigenina, luteolina, galangina) oraz estry kwasów fenolowych (w szczególności estry kwasu kawowego oraz ferulowego). Najwyższą aktywność przeciwnowotworową wykazuje ester fenyloetylowy kwasu kawowego. Jego mechanizm nie jest do końca poznany, wiadomo jednak, że zapobiega on wbudowywaniu tymidyny do łańcucha DNA komórek nowotworowych, przez co uniemożliwia on ich proliferację. W licznych badaniach *in vitro* propolis oraz jego poszczególne składniki biologicznie czynne wykazywały aktywność cytotoksyczną w stosunku do różnych typów komórek nowotworowych, takich jak komórki raka krtani, płuc, trzustki, tarczycy, jelita grubego, sutka, prostaty, a także w stosunku do komórek glejaka złośliwego.

Buřalo i wsp. (20) w badaniach *in vitro* opisali efekt cytotoksyczny zielonego brazylijskiego propolisu w stosunku do komórek raka krtani HEP-2. Wykazali oni, że jedynie niskie stężenia etanolowego ekstraktu propolisu wywoływały długoterminowy, stały efekt cytotoksyczny. Natomiast wyższe stężenia EEP, dodawane do komórek nowotworowych, działały krótkotrwale. Ponadto zauważyli oni, że aktywność ta jest wynikiem synergizmu substancji chemicznych zawartych w propolisie.

Badania Lee i wsp. (21) wykazały, że ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE, ang. *caffeic acid phenethyl ester*) działa cytotoksycznie w stosunku do linii komórkowej szczurzego glejaka C6. W badaniach tych określono bardzo szczegółowy mechanizm działania CAPE. Stwierdzono, że powoduje on uwolnienie cytochromu c z mitochondrium do cytozolu oraz aktywację kaspazy-3, jak również aktywację białek

proapoptycznych z rodziny Bcl-2. Jednoznacznie potwierdzono aktywację mechanizmów biochemicznych prowadzących do kontrolowanej śmierci komórek – apoptozy, w wyniku zastosowania CAPE w stosunku do komórek badanej linii.

Cel pracy

Celem prezentowanej pracy była ocena właściwości cytotoksycznych propolisu w zależności od miejsca pozyskania, jak również użytych stężeń EEP w stosunku do komórek raka okrężnicy HCT 116 w badaniach *in vitro*.

Materiał i metody

Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły próbki propolisu pozyskane od pszczół z pasiek zlokalizowanych w:

- Kamiannej, w powiecie nowosądeckim (P1),
- Łomżyńskim Parku Krajobrazowym Doliny Narwi (P2),
- Korbielowie w powiecie żywieckim (P3).

Aktywność przeciwnowotworową etanolowego ekstraktu propolisu (EEP, ang. *ethanol extract of propolis*) oceniono przy użyciu linii komórkowej raka jelita grubego (okrężnicy) HCT 116 pochodzącej z kolekcji ATCC.

Otrzymywanie etanolowego ekstraktu z propolisu

Próbki propolisu poddano ekstrakcji etanolem. Po mechanicznym rozdrobieniu 10 g surowego kitu pszczelego dodawano do kolb okrągłodennych zawierających 100 g 75% etanolu. Szczelnie zamknięte kolby umieszczono na wytrząsarce na okres dwóch tygodni w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Po tym czasie ekstrakty chłodzono w temp. 4°C przez 24 godz. w celu usunięcia wszystkich substancji nierozpuszczalnych w etanolu. W kolejnym etapie ekstrakty sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu sączka filtracyjnego standardowego nr 4 (Whatman Grade No. 4 Filter Paper). Uzyskany filtrat odparowano za pomocą wyparki próżniowej w temperaturze 40°C. W ten sposób w kolbach okrągłodennych (o znanej masie) otrzymano ciągliwą substancję koloru brązowego, która zawierała nieznaczne ilości rozpuszczalników – etanolu i wody. W następnym etapie umieszczono otrzymane ekstrakty w cieplarni na okres 7 dni w celu odparowania pozostałości rozpuszczalników. Po tym czasie otrzymano suchą masę koloru ciemnobrązowego, która posłużyła do sporządzenia roztworów roboczych. W tym celu EEP rozpuszczono w dimetylosulfotlenku, otrzymując roztwór EEP o stężeniu 51,2 mg/ml (EEP_{DMSO}).

Analiza składu polifenoli oraz flawonoidów w badanych próbkach EEP

Całkowitą zawartość polifenoli w próbkach popolisu określono stosując metodę kolorymetryczną z odczynnikami fenolowym Folin-Ciocalteu. Mieszaninę referencyjną stanowiła pinocembryna oraz galangina w stosunku wagowym 2:1, przygotowana metodą seryjnych rozcieńczeń (od 0,021 do 0,335 mg/ml). Posłużyła ona do wykonania krzywej kalibracyjnej. 1 ml roztworu badanego przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 ml, zawierającej 15 ml wody destylowanej. Następnie dodano 4 ml odczynnika Folin-Ciocalteu i 6 ml 20% roztworu węgla sodu. Całość doprowadzono wodą destylowaną do objętości 50 ml. Absorbancję mierzono po 2 godz. przy długości fali $\lambda=760$ nm.

Całkowitą zawartość flawonoidów określano przez kwantyfikację flawonów/flawonoli i flawanonów/dihydroflawonoli. Roztwory standardowe galanginy (0,04 mg/ml) dla flawonów/flawonoli i pinocembryny (1 mg/ml) dla flawanonów/dihydroflawonoli zostały przygotowane w celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej. Przygotowano serię pięciu rozcieńczeń galanginy w stężeniach od 0,005 do 0,04 mg/ml oraz pinocembryny w stężeniach od 0,1 do 0,8 mg/ml.

Próbkę 1 ml badanego roztworu i 0,5 ml 5% metanolowego roztworu chlorku glinu (AlCl_3) zmieszano w kolbie zawierającej 10 ml metanolu. Objętość doprowadzono do 25 ml poprzez uzupełnienie metanolem i po 30 min mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda=425$ nm względem ślepej próby, w celu ilościowego oznaczenia flawonów/flawonoli.

Próbkę EEP_{DMSO} (1 ml) oraz 2 ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny (1 g DNP), zmieszanego z 2 ml 96% kwasu siarkowego (VI) i rozcieńczonego do 100 ml metanolem, ogrzewano w temperaturze 50°C przez 50 min. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, roztwór rozcieńczono do 10 ml 10% metanolowym roztworem wodorotlenku potasu. Tak uzyskany roztwór w ilości 0,5 ml przeniesiono do kolby miarowej i rozcieńczono ponownie metanolem do objętości 25 ml. W celu oszacowania stosunku flawanonów/dihydroflawonoli, absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda=486$ nm wobec ślepej próby

Próby ślepe przygotowano podobnie, zastępując EEP_{DMSO} równoważną ilością etanolu i przeprowadzono przez wszystkie kroki zastosowanej wyżej procedury. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią zawartość procentową i odchylenie standardowe (SD). Zawartość innych związków polifenolowych oceniano poprzez odjęcie całkowitej zawartości flawonoidów od całkowitej zawartości polifenoli.

Całkowitą zawartość flawonoidów uzyskano przez zsumowanie zawartości flawonów/flawonoli i flawanonów/dihydroflawonoli w badanych próbkach popolisu (22, 23).

Hodowla komórkowa

Doświadczenie wykonano na komórkach raka jelita grubego HCT 116. Linia komórkowa pochodziła z kolekcji ATCC i hodowana była zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu zmodyfikowanego podłoża McCoy's z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Komórki hodowane były w butelkach o powierzchni 25 cm² (PAA) w zmodyfikowanym podłożu McCoy's z dodatkiem następujących antybiotyków 100 IU/ml penicyliny, 100 $\mu\text{l/ml}$ streptomycyny oraz 0,25 $\mu\text{l/ml}$ amfoterycyny B. Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze nasyconej parą wodną z 5% dodatkiem CO_2 .

Po uzyskaniu przez komórki 80% konfluencji, obserwowanej w mikroskopie w układzie odwróconym, dokonywano pasażowania komórek.

Ocena cytotoksyczności testem MTT

W celu określenia cytotoksyczności EEP_{DMSO} komórki raka jelita grubego HCT 116 posiano na płytce 96 dołkowe w ilości 5000 komórek/dołek i dodano świeżej pożywki, a następnie pozostawiono na okres 72 h w celu uzyskania logarytmicznego wzrostu komórek. Po upływie tego czasu pożywkę usunięto, a do dołków dodano podłoże hodowlane zawierające EEP_{DMSO} w stężeniach od 100 $\mu\text{g/ml}$ do 3,125 $\mu\text{g/ml}$, przygotowane poprzez sporządzenie szeregu rozcieńczeń EEP_{DMSO} w podłożu hodowlanym. Następnie po dodaniu 0,1 ml podłoża wraz z określonym stężeniem EEP_{DMSO} , komórki pozostawiono na 24 godz. w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze nasyconej parą wodną z 5% dodatkiem CO_2 . Po tym czasie znad komórek usunięto podłoże i dalej postępowano zgodnie z zaleceniami producenta testu. Odczytu absorbancji dokonano przy użyciu czytnika płytek ELISA firmy BioTek przy długości fali $\lambda=570$ nm.

Kontrolę stanowiły odczyty absorbancji uzyskane z płytek, na których hodowano linie komórkowe bez dodatku EEP_{DMSO} , zawierające dodatkowo rozpuszczalnik (dimetylosulfotlenek) o stężeniu 0,2%.

Ocena cytotoksyczności testem LDH

W celu oceny cytotoksyczności EEP_{DMSO} przy użyciu testu LDH, komórki raka jelita grubego HCT 116 posiano na płytce 96 dołkowe w ilości 10 000 komórek/dołek i dodano świeżej pożywki, a następnie pozostawiono na okres 72 godz. w celu uzyskania ich logarytmicznego

wzrostu. Po upływie 72 godz. pożywkę usunięto, a do dołków dodano podłoże hodowlane zawierające EEP_{DMSO} o stężeniach analogicznych do testu MTT. Następnie komórki pozostawiono na 24 godz. w inkubatorze w temperaturze $37^{\circ}C$ w atmosferze nasyconej parą wodną z 5% dodatkiem CO_2 . Po tym czasie komórki poddano działaniu odczynnika Accutase. Komórki wirowano 5 min przy prędkości 2000 obr./min. Następnie zebrano po $100 \mu l$ supernatantu w trzech powtórzeniach dla każdej próbki badanej. Supernatant przeniesiono na płytkę 96 dołkową i do każdej próbki dodano po $100 \mu l$ roztworu reakcyjnego. Płytkę inkubowano przez 30 min na wytrząsarce orbitalnej w temp pokojowej. Odczytu absorbancji dokonano przy użyciu czytnika płytek ELISA przy długości fali $\lambda = 490 \text{ nm}$. Jako 100% śmiertelność komórek przyjęto odczyt długości fali dla komórek poddanych lizie za pomocą 1% odczynnika Triton X-100.

Kontrolę stanowiły odczyty absorbancji uzyskane z płytek, na których hodowano badane linie komórkowe bez dodatku EEP_{DMSO} , jednakże zawierające rozpuszczalnik (dimetylosulfotlenek) w stężeniu 0,2%.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników

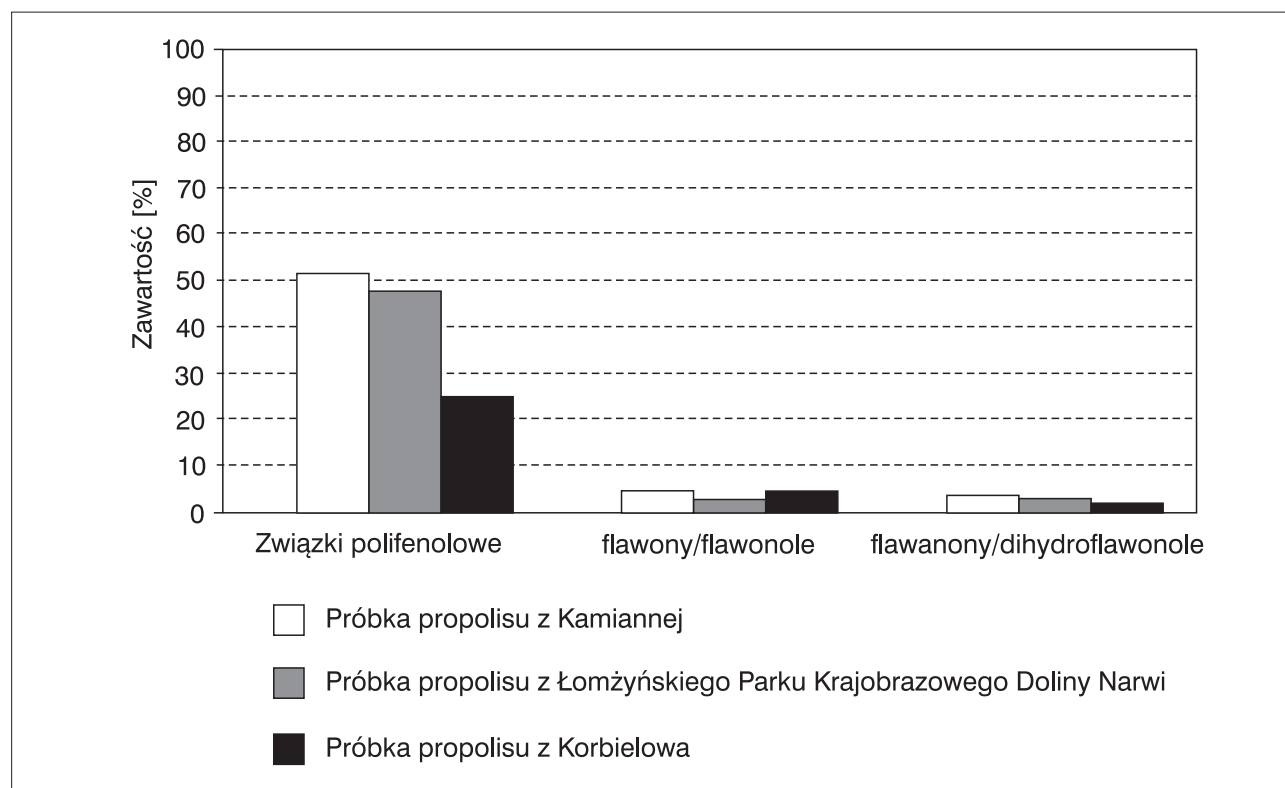
Do utworzenia bazy danych posłużył program Microsoft Excel 2010 for Windows. Analizę staty-

styczną uzyskanych wyników wykonano za pomocą programu Statistica firmy StatSoft. Normalność wyników zbadano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Do oceny wpływu różnych stężeń EEP_{DMSO} na komórki raka jelita grubego HCT 116 użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych.

Badania finansowane były z umowy statutowej nr KNW -1-042/P/2/0.

Wyniki

Analizowane próbki propolisu prezentowały zmienne wartości całkowitej zawartości polifenoli. W próbce pochodzącej z pasieki w Kamiannej (P1) całkowita zawartość związków polifenolowych wynosiła $52,04 \pm 3,26\%$. Nieznacznie niższą zawartość polifenoli stwierdzono w propolisie zebranym od pszczoł z terenu Łomżyńskiego Parku Krajobrazowego Doliny Narwi (P2) – wynosiła ona $48,26 \pm 2,94\%$. Według danych Bankova i wsp. (24, 25) całkowita zawartość związków polifenolowych w propolisie pochodzenia europejskiego nie powinna być mniejsza od 21%. W próbce pochodzącej z Korbielowa (P3) zidentyfikowano najniższą zawartość związków polifenolowych ($25,01 \pm 1,23\%$), lecz mieszcząca się jeszcze w granicach standardu dla propolisu europejskiego, co przedstawiono na rycinie 1.

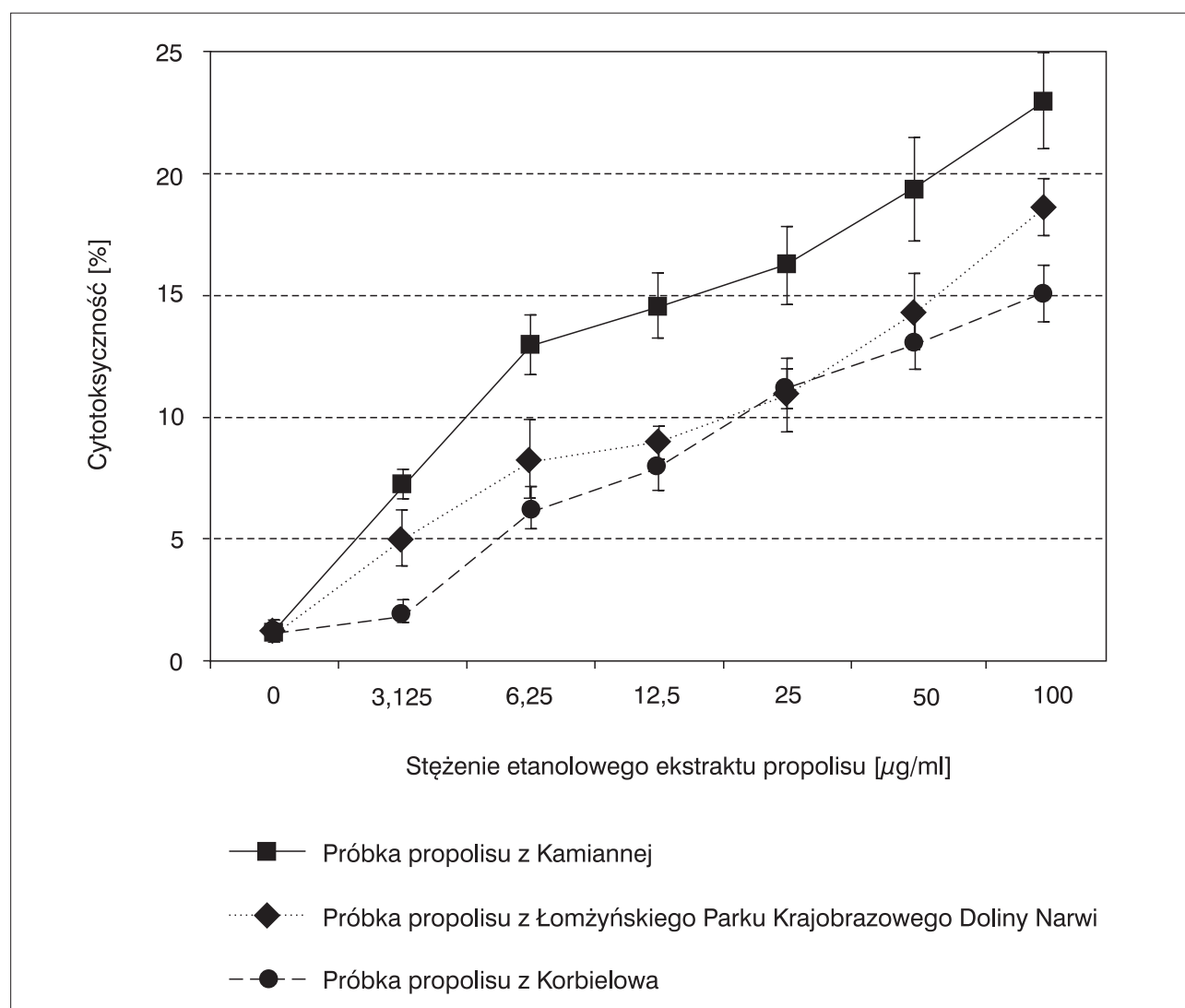


Ryc. 1. Całkowita zawartość polifenoli oraz flawonoidów w badanych próbkach propolisu.

Zawartość procentowa flawonów/flawonoli była podobna we wszystkich trzech próbkach i mieściła się w granicach od 4,76-5,26% i najwyższa była dla próbki pochodzącej z Kamiannej. Podobne wyniki uzyskano także w analizie flawanonów/dihydroflawonoli, najwyższą zawartość wykazywała próbka pochodząca z Kamiannej ($5,14 \pm 0,52\%$), a najniższą – próbka pochodząca z Korbielowa ($3,17 \pm 0,46\%$).

W celu potwierdzenia działania cytotoksycznego etanolowego ekstraktu propolisu zastosowano test kolorymetryczny ukazujący zmiany w metabolizmie mitochondrialnym oraz w aktywności łańcucha oddechowego. Rycina 2 obrazuje, że wraz ze wzrostem stężenia EEP_{DMSO} wzrastał odsetek komórek nekrotycznych. Po 24 godz. inkubacji komórek badanej linii z EEP_{DMSO} z Kamiannej (P1) w stężeniu $3,125 \mu\text{g/ml}$, procent ko-

mórek nekrotycznych wynosił $7,25 \pm 1,26\%$, natomiast takie same stężenia EEP_{DMSO} z Łomżyńskiego Parku Krajobrazowego Doliny Narwi (P2) i Korbielowa (P3) powodowały wzrost odsetka komórek nekrotycznych odpowiednio o $5,03 \pm 2,36\%$ oraz o $2,01 \pm 1,01\%$. Uzyskane wyniki były znamienne statystycznie w porównaniu do kontroli, za wyjątkiem próbki P3. Inkubacja komórek w dwukrotnie wyższych stężeniach odpowiednich EEP_{DMSO} spowodowała znamienne wzrost działania cytotoksycznego próbek na komórki raka we wszystkich przypadkach i wynosiła dla próbki (P1): $12,96 \pm 2,38\%$, dla (P2) – $8,26 \pm 2,16\%$ oraz dla próbki P3 $6,24 \pm 1,01\%$. Przy jeszcze wyższych stężeniach EEP_{DMSO} zaobserwowano porównywalne działania cytotoksyczne próbek P2 oraz P3. Najsilniejszą zdolność cytotoksyczną ($22,96 \pm 3,57\%$), przy



Ryc. 2. Ocena cytotoksyczności 3 próbek etanolowego ekstraktu z propolisu w stężeniach od 0 do $100 \mu\text{g/ml}$ w stosunku do komórek raka okrężnicy HCT 116 po 24 godz. ekspozycji. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 5 eksperymentów.

najwyższym zastosowanym stężeniu, wykazała próbka propolisu z Kamiannej (P1).

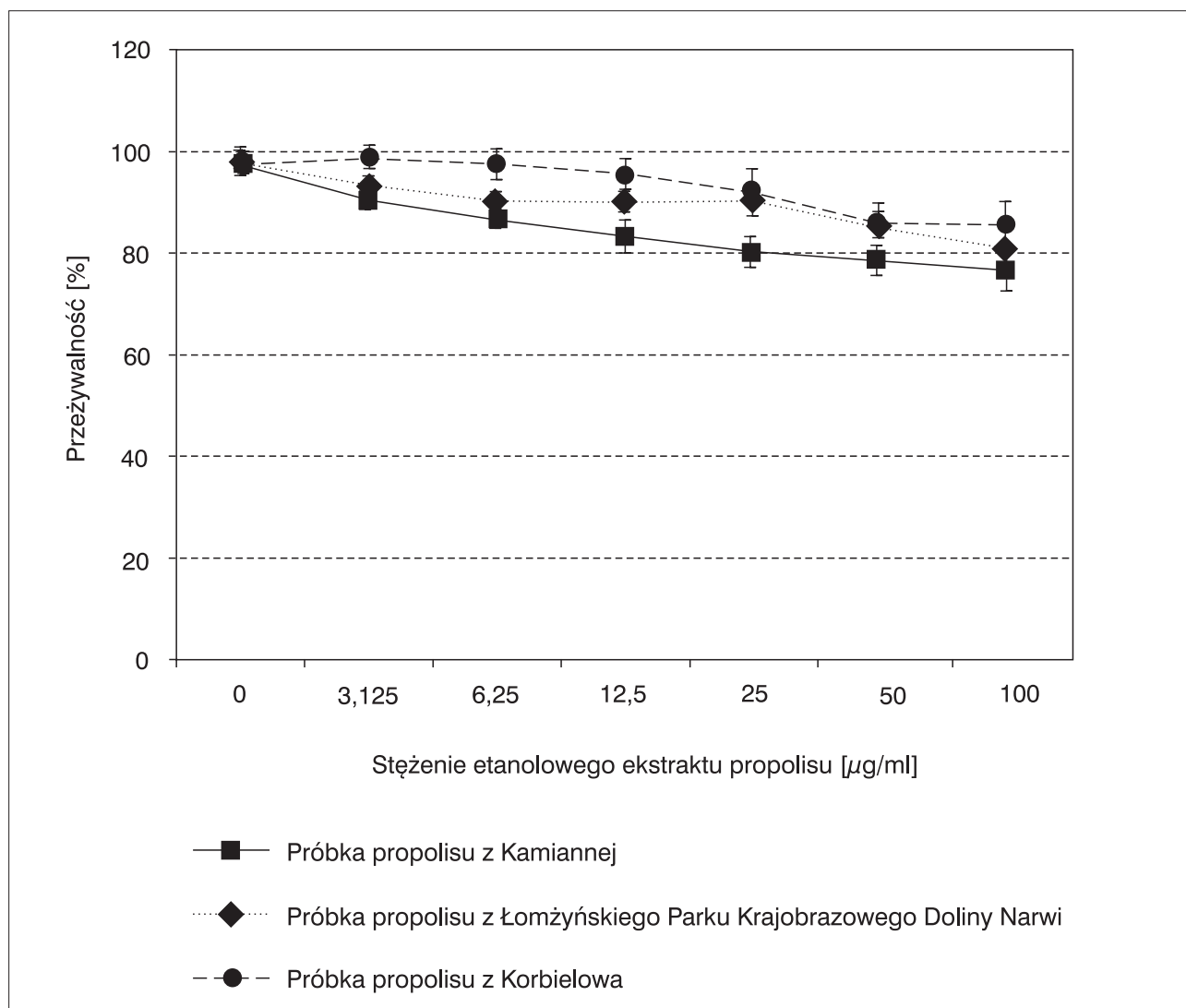
Przeżywalność komórek linii HCT 116 w obecności EEP_{DMSO} oceniono poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej, której zwiększona aktywność w środowisku pozakomórkowym określa stopień cytotoxyczności EEP_{DMSO} względem badanych komórek (uszkodzenie błon komórkowych).

W przeprowadzonych badaniach cytotoksyczny wpływ etanolowego ekstraktu propolisu zależny był od stężenia oraz rodzaju użytego propolisu. Po 24 godz. inkubacji komórek HCT 116 z najniższym badanym stężeniem EEP_{DMSO} zaobserwowano spadek przeżywalności komórek o 9,64% (P1), o 6,46% (P2) oraz o 1,11% (P3) względem kontroli. Najwyższe badane stężenie EEP_{DMSO} spowodowało spadek przeżywalności komórek raka jelita grubego HCT 116 o 22,96% dla

próbki pochodzącej z Kamiannej, o 19,31% dla próbki z Łomżyńskiego Parku Krajobrazowego Doliny Narwi oraz o 14,84% dla próbki pochodzącej z Korbielowa. Wyniki zilustrowano na rycinie 3.

Dyskusja

W ostatnich latach prowadzone są badania mające na celu wykazanie nowych właściwości produktów pochodzenia pszczelego, w tym propolisu. Coraz dłuższy okres życia ludzi, stres, a także chemizacja środowiska doprowadzają do powstawania coraz to większej liczby chorób nowotworowych. Choroby nowotworowe są drugą przyczyną zgonów na świecie zaraz za chorobami układu krążenia. Walka z chorobami nowotworowymi ciągle nie przynosi oczekiwanych efektów, gdyż dotychczasowe metody ich diagnozowania, w fazie znacznego zaawansowania, nie pozwalają na ich



Ryc. 3. Wpływ różnych stężeń próbek etanolowego ekstraktu propolisu na przeżywalność komórek raka okrężnicy linii HCT 116 w wyniku 24 godz. inkubacji komórek raka okrężnicy HCT 116. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 5 eksperymentów.

skuteczne leczenie. Stosowana chemioterapia działa niekorzystnie nie tylko na komórki nowotworowe, ale także na niezmiennione komórki ustroju. Długotrwała chemioterapia powoduje silne wyniszczenie organizmu, uszkodzenie szpiku kostnego oraz wykazuje działanie hepato- i nefrotoksyczne. Jednym z głównych kierunków farmakologii i onkologii jest obecnie poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych, które nie prowadziłyby do niszczenia prawidłowo rozwijających się komórek. Zasadne zatem wydają się badania związków pochodzenia naturalnego, które znajdują się w produktach, czy też roślinach występujących w środowisku naturalnym człowieka.

Wyniki badań prezentowane w pracy wskazują, że obecność propolisu w podłożu hodowlanym prowadziła do zahamowania wzrostu komórek raka okrężnicy HCT 116, jednakże aktywność ta była różna w badanych próbkach propolisu. Uzyskane działanie cytotoksyczne badanych próbek propolisu wykazuje korelację z wynikami uzyskanymi przez wielu badaczy (11, 16-21). Na całym świecie naukowcy badają propolis oraz jego składniki pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Szliszka i wsp. (26) wykazali, iż zawarta w brazylijskim propolisie artelipina C powodowała zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na białko TRAIL. Białko to jest silnym stymulatorem procesu apoptozy w komórkach nowotworowych i ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za eliminowanie rozwijających się guzów. Jednakże wiele komórek objętych procesem onkogenezy jest opornych na śmierć apoptotyczną z udziałem białka TRAIL. W celu potwierdzenia postawionej tezy wykorzystano testy cytotoksyczne (MTT i LDH), barwienie fluorescencyjne (w celu określenia apoptozy), cytometrię przepływową (w celu oceny receptorów śmierci) oraz testy immunoenzymatyczne. Autorzy (26) wykazali, iż zastosowanie powyższego składnika propolisu, wraz z białkiem TRAIL, powodowało zwiększenie liczby komórek obumierających na drodze apoptozy, na drodze zwiększenia aktywności kaspazy-3 i kaspazy-8 oraz hamowania czynnika jądrowego NF- κ B.

Podobne wyniki uzyskali także Jin i wsp. (27), którzy w swojej pracy przeprowadzili podobne doświadczenie na linii ludzkiej białaczki szpikowej U937. Wykazali oni, podobnie jak Lee i wsp. (21), że ester fenyloetylowy kwasu kawowego, zawarty w propolisie, wykazuje działanie cytotoksyczne zależne od stężenia oraz czasu działania substancji na komórki nowotworowe. Używając barwienia DAPI, zaobserwowali oni w mikroskopie fluorescencyjnym charakterystyczne dla procesu apoptozy zmiany w jądrach komórkowych. Nie potwierdzili oni ekspresji białka Fas na powierzchni badanych komórek, jednakże zauważyli uwalnianie

cytochromu c do cytozolu, zahamowanie ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 oraz zwiększenie ekspresji białka proapoptotycznego Bax.

Bardzo interesujące wydają się badania Chen i wsp. (28), którzy zbadali wpływ propoliny A oraz propoliny B, wyizolowanych z tajwańskiego propolisu, na proces apoptozy komórek czerniaka. W swoich badaniach wykazali oni, że propoliny działały przeciwnowotworowo w stosunku do pięciu badanych linii komórek nowotworowych: ludzkiego czerniaka A2058, ludzkiego raka sutka MCF-7, nerwiaka IMR-32, glejaka C6 oraz ludzkiej białaczki HL-60. Traktowanie komórek propoliną A oraz B, w stężeniach od 5,7 do 34,2 μ M, powodowało zmniejszenie żywotności komórek w zależności od dawki. Zauważono także kondensację chromatyny w jądrze komórkowym, co może świadczyć o zapoczątkowaniu procesu apoptozy. W związku z tym komórki poddano elektroforezie w żelu agarozowym. Drabina fragmentacji DNA znacznie wzrosła po zastosowaniu propolin. Indukcję apoptozy potwierdzono także przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. W cytometrii przepływowej zaobserwowano wzrost frakcji sub-G1. Ocenie poddano również kaspazo-zależny szlak sygnałowy, który został aktywowany w wyniku działania badanych związków. W tym celu dokonano oceny aktywności prokaspazy-8 oraz białka Bid. Badacze wykazali, że nastąpił wyraźny spadek stężenia prokaspazy-8 oraz białka Bid. W wyniku zastosowania propolin doszło do szybkiego wydzielania cytochromu c z mitochondrium do cytozolu. Co najważniejsze, po raz pierwszy wykazano, iż w wyniku zastosowania substancji pochodzących z propolisu, dochodziło do zwiększenia ekspresji receptora Fas oraz jego ligandu.

Podobnie Badr i wsp. (29) w badaniach przeprowadzonych na 150 samicach mysich, potwierdzili cytotoksyczne działanie egipskiego propolisu. Myszy zostały podzielone na 3 grupy: 1 – negatywna grupa kontrolna; 2 – myszy otrzymujące dootrzewnowo komórki raka Ehrlicha, nie dostające w diecie propolisu oraz grupa 3 – której podano dootrzewnowo komórki raka Ehrlicha, i której dodatkowo przez 11 dni podawano propolis. Wykazano, że badane komórki nowotworowe poddane działaniu propolisu zmniejszyły swoją objętość, dochodziło także do zmniejszenia całkowitej liczby komórek i wzrostu odsetka komórek martwych oraz do aktywacji układu odpornościowego u badanych myszy.

Natomiast Chen i wsp. (30) przeprowadzili zakrojone na szeroką skalę badania, polegające na wyizolowaniu nowych związków chemicznych z tajwańskiego propolisu i określeniu ich aktywności przeciwnowotworowej. Wykazali oni, iż namyferol A, namyferol B

oraz namyferol C wchodzące w skład tajwańskiego propolisu, wykazywały cytotoksyczne działanie w stosunku do komórek linii raka prostaty PC-3 i DU-145 oraz linii wątrobiaka Hep-3B. Dokonali oni również syntezy 12 nowych związków chemicznych i wykazali, iż 3 spośród nich wykazywały silne działanie cytotoksyczne w stosunku do badanych komórek. Związki te ujawniły silniejsze działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek PC-3, niż powszechnie stosowany 5-fluorouracyl. Przy pomocy cytometrii przepływowej, barwienia aneksyną V oraz jodkiem propidyny, potwierdzili także proapoptotyczne działanie badanych związków.

Podobne badania przeprowadzili Omene i wsp. (31) wykazując, iż ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE), wykazuje silne właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek linii gruczolakoraka sutka MDA-231. CAPE powodował obniżenie ekspresji genu oporności wielolekowej, genu jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, genu naskórkowego czynnika wzrostu EGFR oraz genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF. W pracy tej skupiono się także na wpływie CAPE na rakowe komórki macierzyste. W tym celu wyizolowano komórki macierzyste z linii gruczolaka sutka MDA-231 o charakterystycznym fenotypie CD44+/CD24- i poddano je działaniu CAPE. W ten sposób potwierdzono, że związek ten powodował spadek liczby rakowych komórek macierzystych o fenotypie CD44+/CD24- aż o 95%. Wyniki te sugerują, że CAPE wykazuje zdolność hamowania podziału rakowych komórek macierzystych, przez co hamuje odnowę komórek rakowych oraz rakowych komórek macierzystych.

Z kolei Scifo i wsp. (32) porównują działanie ekstraktu propolisu ze stosowanymi w chemioterapii związkami półsyntetycznymi, takimi jak np. vinorelbina. W badaniach *in vitro* na linii komórkowej raka prostaty DU145 oznaczono parametry, takie jak integralność błon komórkowych, status oksydo-redukcyjny, żywotność komórek (test MTT), zmianę potencjału błonowego mitochondriów oraz fragmentację genomowego DNA. Potwierdzono, że propolis wykazuje działanie przeciwnowotworowe, prowadząc do śmierci komórek zarówno na drodze nekrozy, jak i apoptozy. Naukowcy sugerują także, iż dokładna analiza składu propolisu może doprowadzić do użycia poszczególnych substancji biologicznie czynnych zawartych w tym produkcie w rutynowej chemioterapii lub wspomaganiu leczenia syntetycznymi chemioterapeutykami.

Propolis pochodzenia holenderskiego, podobnie jak inne badane ekstrakty, wykazuje działanie przeciwproliferacyjne. Japońscy naukowcy wykazali, że ekstrakty

propolisu oraz poszczególne substancje czynne hamowały wzrost komórek nowotworowych, zarówno ludzkich linii komórkowych (włókniakomięsa HT1080 oraz raka gruczołowego płuc A549), a także mysich komórek nowotworowych (jelita grubego 26-L5 oraz czerniaka B16-BL6). Estry kwasu kawowego działały podobnie jak stosowany powszechnie cytostatyk 5-fluorouracyl w odniesieniu do 3 z 4 badanych linii komórkowych. Najmniej wrażliwymi komórkami nowotworowymi okazały się komórki raka gruczołowego płuc linii A549 (33).

Przeciwnowotworowe działanie propolisu potwierdzili również w swoich badaniach Barbari \acute{c} i wsp. (34). Wykazali oni, że zastosowanie etanolowego ekstraktu propolisu w stosunku do linii raka szyjki macicy HeLa powoduje silne działanie cytotoksyczne. Szczególnie silne działanie przeciwnowotworowe (od 60 do 85%) zaobserwowano przy stężeniu tego ekstraktu w ilości 1 mg/ml. Nie wyjaśnili oni jednak związku pomiędzy składem chemicznym 20 próbek propolisu, a ich aktywnością biologiczną. Stwierdzają natomiast, że efekt cytotoksyczny w stosunku do badanej linii komórkowej nie zależy od stężenia poszczególnych składników propolisu lecz jest wynikiem synergistycznego działania kwasów fenolowych oraz flawonoidów.

Wnioski

1. Etanolowe ekstrakty z propolisu wykazują działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek raka jelita grubego HCT 116.
2. Aktywność cytotoksyczna zależna była od pochodzenia próbki propolisu oraz od użytego stężenia EEP.
3. Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowanie składu chemicznego propolisu. Najwyższą zawartością związków polifenolowych odznaczała się próbka z Kamiannej (powiat nowosądecki) i to ona wykazywała najwyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do badanej linii komórkowej.
4. Uzyskane wyniki potwierdzają zależność działania propolisu od oznaczonych związków polifenolowych zawartych w badanych próbkach propolisu.

Piśmiennictwo

1. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Produkty pszczoł w medycynie. Wyd. Apis, Lublin 2007.
2. Kędzia B. Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych. *Herba Pol* 2008; 54(4):179-86.
3. Tichonov IR, Jarnych TG, Czernych WP i wsp. Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatów propolisowych. Wyd. Apipol Farma, Myślenice 2007.
4. Velazquez C, Navarro M, Acosta A i wsp. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl Microbiol* 2007; 103:1747-56.
5. Wojtyczka RD, Kubina R, Kabała D i wsp. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa etanolowego ekstraktu propolisu. *Ann Acad Med Siles* 2012; 66(2):39-48.
6. Kabała-Dzik A, Szaflarska-Stojko E,

- Wojtyczka RD. Comparative studies on the antimicrobial activity of propolis balm and silver sulphadiazine applied to burn wounds in pigs. *Bull Vet Inst Pulawy* 2003; 47:541-5. **7.** Nilforoush-zadeh MA, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A i wsp. Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucan time in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. *J Vector Borne Dis* 2008; 45(4):301-6. **8.** Pontin K, Da Silva-Filho AA, Santos FF i wsp. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 2008; 103(3):487-492. **9.** Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr Med Assoc J* 2002; 4:923-7. **10.** Basnet P, Matusushige K, Hase K i wsp. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(4):655-7. **11.** Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J i wsp. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73(9):117-24. **12.** da Silva-Frezza CO, Garcia CS, Gambato G i wsp. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 2012; 52C:137-142. **13.** Alyane M, Kebsa LB, Boussenane H i wsp. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci* 2008; 21(3):201-9. **14.** Bricević H, Kostić A, Gaon ID. The examination of propolis as a potential local anesthetic. *Stomatol Vjesn* 1981; 10(3-4):125-8. **15.** Kang LJ, Lee HB, Bae HJ i wsp. Antidiabetic effect of propolis: reduction of expression of glucose-6-phosphatase through inhibition of Y279 and Y216 autophosphorylation of GSK-3 α/β in HepG2 cells. *Phytother Res* 2010; 24(10):1554-61. **16.** Tavares DC, Mazzaron-Barcelos GR, Silva LF i wsp. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(7):1154-8. **17.** Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S i wsp. *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:27. **18.** Li F, Awale S, Tezuka Y i wsp. Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Nat Prod Commun* 2010; 5(10):1601-6. **19.** Kubina R, Kabała-Dzik A, Bułdak R i wsp. Ocena właściwości proapoptycznych etanolowego ekstraktu propolisu w badaniach *in vitro*. *Post Fitoter* 2011; 4:232-7. **20.** Búfalo MC, Candeias JM, Sforcin JM. *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6(4):483-7. **21.** Lee YJ, Kuo HC, Chu CY i wsp. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 15(66):2281-9. **22.** Chang CC, Yang MH, Wen i wsp. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002; 10:178-82. **23.** Popova M, Bankova VS, Butovska D i wsp. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar type propolis. *Phytochem Anal* 2004; 15:235-40. **24.** Bankova V. Propolis standard: update, International Honey Commission Group Standards for bee products other than honey, Tzarevo 2008. **25.** Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2):114-7. **26.** Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E i wsp. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LN-CaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol* 2012; 41(3):818-28. **27.** Jin UH, Song KH, Motomura M i wsp. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* 2008; 310(1-2):43-8. **28.** Chen CN, Wu CL, Lin JK. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Cancer Lett* 2007; 245(1-2):218-31. **29.** Badr MO, Edrees NM, Abdallah AA i wsp. Anti-tumour effects of Egyptian propolis on Ehrlich ascites carcinoma. *Vet Ital* 2011; 47(3):341-50. **30.** Chen CN, Hsiao CJ, Lee SS i wsp. Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Nat Prod Res* 2012; 26(2):116-24. **31.** Omene CO, Wu J, Frenkel K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Invest New Drugs* 2012; 30(4):1279-88. **32.** Scifo C, Milasi A, Guarnera A i wsp. Resveratrol and propolis extract: an insight into the morphological and molecular changes induced in DU145 cells. *Oncol Res* 2006; 15(9):409-21. **33.** 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(1):67-73. **34.** Barbarić M, Mišković K, Bojić M i wsp. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 135(3):772-8.

otrzymano/received: 23.01.2013
zaakceptowano/accepted: 05.02.2013

Adres/address:
*mgr Robert Kubina
Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec
tel.: +48 (32) 364-13-50
e-mail: rkubina@sum.edu.pl