

Wpływ propolisu na toksyczność fluoru w badaniach *in vitro***

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

THE EFFECT OF PROPOLIS AGAINST TOXICITY OF SODIUM FLUORIDE IN VITRO

SUMMARY

Propolis is a substance produced by honey bees and its components among other are strong antioxidant and free radical scavengers. Flavonoids and phenolic acids are major classes of polyphenolic substances which may act as potent antioxidant. Numerous researches showed that propolis exhibits many healing properties such immunoprotective and hepatoprotective activities, but also anti-proliferative ones. The aim of this study was to evaluate the protective effects of propolis against toxicity sodium fluoride in vitro. The ethanol extract of propolis (EEP) in dimethyl sulfoxide was used for the research. Ethanol from the extraction of propolis was removed by vaporization under vacuum. The cytotoxicity was evaluated by means of the MTT and LDH assays. The study was conducted using the WI-38 lung fibroblasts. The protective effect of EEP from Kamianna at concentrations of 50 and 100 µg/ml after a 24, 48 and 72 h incubation was observed in all examined concentration of sodium fluoride in medium. It depended on time, too. The increase of protective effect on fibroblast cell line was higher after administration of EEP with of 100 µg/ml vs. 50 µg/ml. The doses of propolis which we served demonstrated better protective effect in presence lower concentrations of fluoride sodium. The results of the present study revealed that administration of propolis decrease toxicity sodium fluoride in fibroblast culture.

KEY WORDS: CYTOTOXICITY – ETHANOL EXTRACT OF PROPOLIS – FLUORIDE SODIUM – WI-38 LUNG FIBROBLASTS

Wstęp

Fluor należy do pierwiastków wykazujących korzystne działanie w zapobieganiu próchnicy zębów przez miejscowe stosowanie w stomatologii w pastach do zębów lub fluoryzację wody. Korzystne działanie fluoru związane jest także z jego wpływem na kości (1). Jednakże długotrwała ekspozycja na wysokie stężenia fluoru wyraża się szkodliwym działaniem na zęby, kości i inne narządy (1, 2). Głównie jest to narażenie środowiskowe. Ostatnie, licznie prowadzone badania

wskazują, że przekroczenie dawek dopuszczalnych zwiększa się nawet w tych rejonach, gdzie nie ma narażenia endemicznego. Związane jest to z narażeniem na fluor z różnych źródeł jednocześnie. Źródłem fluoru, poza wodą, są produkty spożywcze, preparaty stomatologiczne, emisje przemysłowe i leki (1). Fluor stanowi naturalne zanieczyszczenie wody. Endemiczna fluoroza jest poważnym problemem w wielu krajach Azji (Indie, Chiny), Ameryki (Meksyk), Europy (Hiszpania), czy Afryki (Tanzania), dotyczącym milionów ludzi używających wody gruntowej o zwiększonej zawartości fluorków (> 1,5 ppm) (2, 3). Osoby mieszkające na terenach, gdzie zanieczyszczenie fluorem jest znacznie wyższe niż dopuszczalne, cierpią nie tylko z powodu fluorozy kości i zębów, ale także z powodu wpływu na różne narządy w wyniku zaburzenia ich funkcji (4).

Przewlekłe narażenie na szkodliwe działanie fluoru zaburza procesy metaboliczne w sercu, wątrobie, nerkach, trzustce, przewodzie pokarmowym, płucach, mózgu. Zmianom biochemicznym towarzyszą zmiany morfologiczne w różnych narządach (1, 3). Wykazano istotny wpływ fluoru na metabolizm węglowodanów, białek i tłuszczów (2, 3). Jest to następstwem jego oddziaływania na aktywność enzymów uczestniczących w metabolizmie komórkowym. Wykazano, że fluor hamuje aktywność enzymów szlaku glikolizy, β-oksydacji, cyklu Krebsa, łańcucha oddechowego. Ponadto hamuje również aktywność Na⁺/K⁺-ATPazy. Prowadzi to do wyczerpania zapasów adenozyntrifosforanu (ATP) oraz do zaburzenia błonowego potencjału komórki. W badaniach wykazano, że fluorki mogą też stymulować aktywność enzymatyczną. Do enzymów aktywowanych przez fluor należą: cyklaza adenylanowa i fosfoglukomutaza. Mechanizm hamowania aktywności enzymów wynika z wiązania się jonów fluorkowych z grupami aminokwasowymi wchodzącymi w skład centrum aktywnego enzymu. Ponadto jony fluorkowe wpływają na aktywność enzymów poprzez

**Badania finansowane z umowy statutowej nr KNW-1-044/K/3/0.

wiązanie się z metalami: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} i Mo^{2+} , znajdującymi się w centrum aktywnym metaloenzymów (4).

Wykazano także neurotoksyczne działanie fluoru. Badania epidemiologiczne dowiodły, że fluor wpływa negatywnie na procesy uczenia się. Powoduje zaburzenia pamięci (5). W badaniach eksperymentalnych wykazano niekorzystny wpływ fluoru na reprodukcję, zwrócono uwagę na jego działanie teratogenne oraz na przedwczesne starzenie (2, 6).

Działanie szkodliwe fluoru wykazano także w badaniach *in vitro*. W hodowlach neuronów i odontoblastów wykazano hamujące działanie fluoru na wydzielanie i/lub syntezę białek oraz wpływ na różne ścieżki sygnałowe zaangażowane w proces proliferacji i apoptozy, m.in. na kinazy białkowe aktywowane miogenem (MAPK), białko p53 oraz na czynniki transkrypcyjne AP-1 (ang. activator protein 1) i NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (7, 8).

Natomiast w hodowlach fibroblastów wykazano mechanizmy cytotoksycznego oddziaływania fluoru (9, 10). Najliczniejsze badania *in vitro* odnośnie oddziaływania toksycznego fluoru wykonano w hodowlach osteoblastów – komórek kostnych (11, 12). W hodowlach wykazano także wpływ cytotoksyczny jonów fluorkowych w odniesieniu do komórek nowotworowych, między innymi w hodowlach kostniako-mięsaka (13) i w komórkach białaczki HL-60 (14).

W licznych, ostatnio prowadzonych badaniach wykazano, że istotną rolę w powstawaniu obserwowanych zmian po narażeniu na fluor odgrywają również zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej. W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano, że przyczyniają się one do nadmiernej peroksydacji lipidów poprzez osłabienie obrony antyoksydacyjnej ustroju, co jest przyczyną stresu oksydacyjnego (15, 16).

Nasilenie procesów oksydacyjnych wykazano także w badaniach *in vitro*. Obserwacje takie poczyniono w odniesieniu do hepatocytów (17), erytrocytów (18) i osteoblastów (19, 20) narażonych na jony fluorkowe.

Zatem skuteczne działanie antytoksyczne, które wynika także z indukcji stresu oksydacyjnego przez fluor w organizmie, musi być związane ze stworzeniem wydajnego układu kontrolującego procesy utleniania. W wielu badaniach *in vivo* potwierdzono działanie ochronne nieenzymatycznych związków antyoksydacyjnych: witamin i antyoksydantów niewitaminowych przeciwko skutkom narażenia na fluor. Wydaje się celowe kontynuowanie badań z zastosowaniem antyoksydantów, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, w celu opracowania profilaktyki w warunkach zwiększonego narażenia na fluor. Ostatnio sięga się po produkty

pochodzenia naturalnego, zawierające związki o działaniu antyoksydacyjnym, które mogą być spożywane bez ryzyka przedawkowania, na co zwraca się uwagę przy suplementacji preparatami witaminowymi.

Na uwagę zasługuje propolis, jeden z najlepiej poznanych produktów pszczelich. Skład chemiczny propolisu jest niezwykle złożony. Zawarte w nim związki wykazują cenne, lecznicze właściwości, między innymi przeciwbakteryjne (21), przeciwmutagenne (22), przeciwhepatotoksyczne (23), przeciwzapalne (24) i antyoksydacyjne (25, 26). To ostatnie działanie uwarunkowane jest obecnością w propolisie między innymi dużej ilości i różnorodności związków flawonowych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują różne polifenole o wielokierunkowym działaniu, co powoduje, że wiąże się z propolisem nadzieję na wykorzystanie go w profilaktyce wielu chorób lub w przeciwdziałaniu skutkom narażenia na różne ksenobiotyki, w działaniu których istotną rolę odgrywa generowanie stresu oksydacyjnego. Związki polifenolowe odpowiedzialne są za hamowanie procesów wolnorodnikowych, jak również usuwanie z organizmu powstałych już wolnych rodników. Należą do nich, m.in. kwercetyna, chryzyna, tektochryzyna i wiele innych. Aktywność przeciwutleniającą wykazują również zawarte w propolisie fenolokwasy, usuwające rodniki nadtlenkowe, hydroksylowe, hydroksynadtlenkowe. Ponadto chelatują one jony żelaza i hamują oksydazy (25, 26). W efekcie końcowy efekt ochronny może być znacznie lepszy niż suplementacja diety witaminami.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu różnych stężeń propolisu na cytotoksyczność i przeżywalność linii fibroblastów WI-38, w hodowlach prowadzonych w obecności różnych stężeń jonów fluorkowych.

Materiał i metody

Materiał do badań

Badania przeprowadzono na propolisie pozyskanym od pszczół z pasieki w Kamiannej (pow. nowosądecki). Do badań użyto fluorku sodu (Avantor Performance Materials, Gliwice).

Ocenę wpływu etanolowego roztworu propolisu na toksyczność fluorku wykonano na linii komórkowej o nazwie Adherentne fibroblasty płucne WI-38 (ATCC) uzyskane z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu.

Skład chemiczny użytego do badań propolisu

Metodyka i wyniki analizy składu chemicznego etanolowego ekstraktu propolisu użytego do badań,

zostały opublikowane wcześniej (27). Analizowana próbka propolisu zawierała polifenole i flawonoidy. Całkowita zawartość związków polifenolowych w próbkach propolisu użytych do badań wynosiła $52,04 \pm 3,26\%$. Zawartość procentowa flawonów i flawonoli wynosiła $5,26 \pm 0,95\%$. Podobne wyniki uzyskano także w analizie flawanonów i dihydroflawonoli, których zawartość wynosiła $5,14 \pm 0,52\%$. Wśród kwasów fenolowych o aktywności antyoksydacyjnej obecnych w analizowanej próbce występowały kwasy: kawowy, galusowy, ferulowy i kumarynowy (27).

Otrzymywanie etanolowego ekstraktu propolisu (EEP)

Propolis zebrany został na przełomie lipca i sierpnia 2013 r. w pasiece „Barć” im. Ks. dra Henryka Ostacha w Kamiannej. Propolis do czasu ekstrakcji przechowywany był w temp. 4°C bez dostępu światła. W celu otrzymania ekstraktu 10 g surowego propolisu rozdrobniono mechanicznie i zalano 100 g 75% (v/v) alkoholu etylowego (Avantor Performance Materials, Gliwice).

Tak przygotowany ekstrakt umieszczono w szczelnie zamkniętych kolbach na okres dwóch tygodni w temp. pokojowej i wytrząsano bez dostępu światła. Po tym czasie uzyskany ekstrakt schładzano przez 24 godz. w temp. 4°C . Następnie ekstrakt przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany filtrat odparowano za pomocą wyparki próżniowej w temp. 40°C . W celu usunięcia resztek etanolu kolby umieszczono w cieplarni na okres 3 dni. Zawartość kolby zważono i rozpuszczono w czystym dimetylosulfotlenku (DSMO) (Avantor Performance Materials, Gliwice) do uzyskania stężenia podstawowego 50 mg/ml.

Hodowla komórkowa

Adherentne fibroblasty płucne WI-38 hodowano zgodnie z zaleceniami producenta przy użyciu podłoża Eagle’a z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS Thermo Scientific HyClone).

Zarówno stężenia jonów fluorkowych w podłożu, jak i stężenia ekstraktu propolisu, zostały wyznaczone empirycznie. Ostatecznie prowadzono hodowle fibroblastów w obecności następujących stężeń fluorku sodu w podłożu: 30, 60, 90, 120 i 150 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie prowadzono hodowle fibroblastów w obecności wybranych stężeń propolisu w DSMO (EEP_{DSMO}): 50, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Ostatecznie do oceny wpływu propolisu na toksyczność fluoru wybrano stężenia optymalne dostosowane do osiągnięcia zamierzonego celu pracy (50 i 100 $\mu\text{g/ml}$).

Hodowla komórek odbywała się w inkubatorze CO_2 firmy Heraeus w temp. 37°C w atmosferze powietrza

wzbogaconego 5% dwutlenkiem węgla. W celu zahamowania ewentualnego rozwoju bakterii i grzybów podłoże suplementowano antybiotykami oraz fungistatykiem o końcowych stężeniach: 100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ i 0,25 $\mu\text{g/ml}$ odpowiednio dla penicyliny, streptomycyny oraz amfoterycyny B. Podłoże zmieniano co 2-3 dni, a pasażu dokonywano przy konfluencji równej 80% obserwowanej w mikroskopie odwróconym (Axiovert 25, Carl Zeiss).

Ocena żywotności komórek

Do oceny żywotności komórek zastosowano test MTT. Test ten polega na kolorymetrycznym oznaczeniu barwnego produktu, powstającego po dodaniu soli tetrazolowej do hodowli komórkowej w obecności substancji badanych. Ilość powstającego w wyniku reakcji formazanu jest proporcjonalna do liczby żywych komórek.

Fibroblasty linii WI-38 posiewano na płytki 96-studzienkowe w liczbie 10000 komórek/dolek i dodawano świeżej pożywki Eagle’a. Komórki pozostawiano na okres 72 godz. Po tym czasie pożywkę usuwano, a do studzienek przenoszono podłoże hodowlane nie zawierające jonów wapnia, suplementowane badanymi substancjami.

Płytki

Płytką kontrolna 1 stanowiła kontrolę wzrostu fibroblastów. W tym celu na całą płytkę posiewano fibroblasty WI-38 zawieszony w podłożu DMEM (bez jonów Ca^{2+}) bez dodatku fluorku sodu i bez dodatku EEP.

Płytką kontrolna 2 stanowiła kontrolę rozpuszczalnika dimetylosulfotlenku (DSMO). W tym celu na płytkę posiewano fibroblasty zawieszony w podłożu DMEM (bez jonów Ca^{2+}) i dodawano DSMO o stężeniu końcowym 0,3% (najwyższe użyte stężenie DSMO).

Na całe płytki badane posiewano fibroblasty WI-38 zawieszony w podłożu DMEM (bez jonów Ca^{2+}). Maksymalna objętość zawiesiny komórek wynosiła 200 μl . Połowa płytki zawierała wyłącznie fibroblasty oraz podłoże wzrostowe DMEM (bez jonów Ca^{2+}), natomiast druga połowa każdej kolejnej płytki od 1 do 5 zawierała dodatkowo pożywkę hodowlaną zawierającą: 30, 60, 90, 120 i 150 μg NaF/ml. Do następnych 3 płytek dodawano kolejno pożywki zawierające: 50, 100 i 200 μg EEP_{DSMO} /ml.

Ocenę żywotności komórek traktowanych fluorem lub EEP dokonano w trzech odstępach czasowych. Oznaczenia wykonano po 24, 48 i 72 godz.

W ramach dalszych badań oceniano wpływ propolisu na żywotność komórek hodowanych w obecności fluoru.

Oznaczenia wykonano podobnie jak poprzednio po 24, 48 i 72 godz. w hodowlach fibroblastów prowadzonych w obecności tych samych stężeń fluorku sodu w podłożu hodowlanym (30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g/ml}$) z dwoma stężeniami EEP_{DMSO} (50 i 100 $\mu\text{g/ml}$). Do hodowli użyto podłoże hodowlane DMEM niezawierające jonów wapnia, suplementowane badanymi substancjami. Płytki kontrolne przygotowywano jak wyżej.

Na całe płytki badane posiewano fibroblasty WI-38 zawieszono w podłożu DMEM (bez jonów Ca^{2+}). Maksymalna objętość zawiesiny komórek wynosiła 200 μl . Połowa płytki zawierała wyłącznie fibroblasty oraz podłoże wzrostowe DMEM (bez jonów Ca^{2+}), natomiast druga połowa kolejnych płytek (od 3 do 7) zawierała dodatkowo 30, 60, 90, 120 i 150 $\mu\text{g NaF/ml}$ oraz 50 $\mu\text{g EEP}_{\text{DMSO}}/\text{ml}$, jak również kolejnych płytek (od 8 do 12) 30, 60, 90, 120 i 150 $\mu\text{g NaF/ml}$ oraz 100 $\mu\text{g EEP}_{\text{DMSO}}/\text{ml}$.

Analizę wpływu propolisu na toksyczność fluorku sodu również oceniano w trzech odstępach czasowych: po 24, 48 i 72 godz.

Po upływie 24 godz. znad komórek usuwano podłoże i dodawano po 100 μl 1% roztworu MTT w podłożu DMEM (bez jonów Ca^{2+}). Komórki inkubowano z odczynnikami przez 4 godz. w inkubatorze w temp. 37°C. Po tym czasie znad kryształów zlewano roztwór MTT, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczono, dodając do każdej studzienki po 200 μl DMSO i dokładnie mieszano w celu rozpuszczenia powstałych kryształów. Odczytu absorbancji dokonywano przy użyciu czytnika płytek ELISA (BioTek) przy długości fali 570 nm.

W przypadku pozostałych płytek po 24 h wymieniano podłoże i pozostawiano je na kolejne 24 godz. Po tym czasie dokonywano w sposób analogiczny odczytu absorbancji po 48 godz. Ostatniego odczytu, po wymianie podłoża i hodowli, dokonywano po 72 godz.

Badanie cytotoksyczności fibroblastów oraz wyznaczenie dawki IC_{50}

Dla badanej linii komórkowej wyznaczono wartości IC_{50} , tj. stężeń fluorku sodu, w których żywotność badanej linii fibroblastów WI-38 była zahamowana w 50% hodowli.

Wartość IC_{50} obliczono przy pomocy oprogramowania ED_{50} plus software wersja 1.0 w postaci arkusza kalkulacyjnego do analiz farmakologicznych Microsoft Excel, pozwalającego na tworzenie i analizowanie krzywych: dawka/odpowiedź.

W badaniach *in vitro* oceniano także wpływ EEP na cytotoksyczność fluorku w hodowlach fibroblastów narażanych na jony fluorkowe w podłożu.

W tym celu po osiągnięciu stanu bliskiego konfluencji, komórki dwukrotnie przepłukano roztworem PBS i zawieszono w podłożu przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny w EDTA. Zawieszono komórki odwirowywano (1000 x g) przez 3 min w temp. 25°C. Uzyskany osad komórkowy zawieszono w odpowiedniej ilości medium pomiarowego z dodatkiem 1% bydlęcej surowicy płodowej w taki sposób, aby końcowa zawiesina zawierała 1×10^5 komórek/ml. Do każdej studzienki mikropłytki hodowlanej (z wyjątkiem studzienki będącej kontrolą tła) dodawano po 100 μl wcześniej przygotowanej zawiesiny komórek oraz po 100 μl medium hodowlanego. Każda płytka zawierała trzy rodzaje kontroli:

Kontrola tła (I) – studzienka zawierała wyłącznie 200 μl podłoża hodowlanego, kontrolę spontanicznego uwalniania LDH (II) – studzienka zawierała 100 μl podłoża badanego oraz 100 μl zawiesiny komórek oraz kontrolę maksymalnego uwalniania LDH (III) – studzienka zawierała 100 μl roztworu Triton-X (stężenie końcowe 2%) w medium pomiarowym i 100 μl zawiesiny komórek.

Następnie komórki inkubowano 48 godz. w inkubatorze w temp. 37°C w atmosferze nasyconej parą wodną i 5% CO_2 . Bezpośrednio przed badaniem przygotowywano rozcieńczenia testowanych substancji w medium pomiarowym, tak aby końcowa objętość wszystkich składników w studzience wynosiła 200 μl . Następnie usuwano medium pomiarowe znad komórek osadzonych na dnie studzienek i dodawano po 100 μl świeżego medium pomiarowego oraz po 100 μl odpowiednich stężeń testowanych substancji. Próby badane były analogicznie jak w przypadku testu MTT. Komórki inkubowano w temp. 37°C w atmosferze nasyconej parą wodną i 5% CO_2 przez 24, 48 oraz 72 godz. Po upływie określonego czasu inkubacji zbierano po 100 μl supernatantu z każdej płytki i przenoszono do płytek mikrotestowych (96 studzienek) i dodano po 100 μl mieszaniny reakcyjnej. Płytki mikrotestowe inkubowano w temp. pokojowej przez 30 min bez dostępu światła. Po określonym czasie wykonano pomiar absorbancji każdej próbki przy użyciu czytnika ELISA przy długości fali 490 nm. Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach.

Cytotoksyczność w % wyliczano ze wzoru:

$$\text{Cytotoksyczność \%} = \frac{(\text{Abs}_{\text{próby badanej}} - \text{Abs}_{\text{II kontroli}})}{(\text{Abs}_{\text{III kontroli}} - \text{Abs}_{\text{II kontroli}})}$$

Do utworzenia bazy danych posłużył program Microsoft Excel 2010. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 8.0 (Statsoft). Wiarygodność wyników analizowano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Do oceny istotności statystycznej badanych wyników

użyto testu t-studenta oraz jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla jednego analizowanego czynnika oraz wieloczynnikowej analizy wariancji ANOVA dla różnych czynników rozpatrywanych łącznie. Za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki

Ocena żywotności fibroblastów

Na rycinie 1 zilustrowano cytotoksyczność fibroblastów, wyrażoną w procentach w zależności od czasu i stężenia fluorku sodu w podłożu. Wykazano istotne podwyższenie odsetka komórek nekrotycznych (z wyjątkiem najniższego stężenia NaF po 24 godz.) wraz ze wzrostem stężenia fluorku sodu w podłożu. Podobnie cytotoksyczność rosła wraz z czasem trwania narażenia. Była ona odpowiednio wyższa po kolejnych dobach. Najwyższą cytotoksyczność wykazano w hodowlach fibroblastów po 72 godz. w obecności 150 μg NaF/ml w podłożu (wynosiła $78,2\% \pm 6,46\%$), zaś najniższą po pierwszej dobie ($5,36 \pm 2,49\%$) przy stężeniu 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NaF. Najniższą cytotoksyczność stwierdzono po 48 godz. Wynosiła ona $32,47 \pm 4,26\%$. Natomiast przy narażeniu na fluorek sodu w stężeniu 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, procent komórek nekrotycznych po 2 i 3 dobach był zbliżony i wynosił odpowiednio: $37,43 \pm 5,19\%$; $38,26 \pm 5,91$. Cytotoksyczność na poziomie $50,11 \pm 8,41\%$ obserwowano po 72 godz. przy stężeniu 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NaF.

Na podstawie otrzymanych danych oraz modelu matematycznego opisanego wcześniej, wyznaczono

dawkę IC_{50} , wyrażającą stężenia fluorku sodu, przy których następowało 50% obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych (tab. 1).

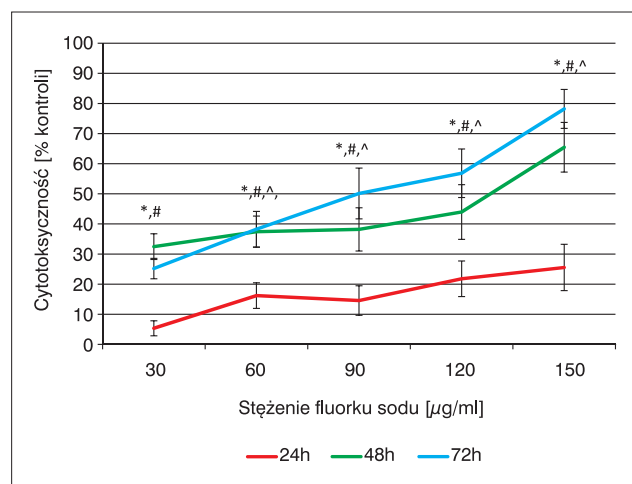
Jak wynika z tabeli 1 wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji komórek na fluorek sodu znacznie maleje wartość IC_{50} , co wskazuje, że wyraźnie zależy ona od czasu narażenia.

Jak można zaobserwować na ryc. 1 inkubacja fibroblastów linii WI-38 z fluorkiem sodu przez 24 godz. nie powoduje silnej reakcji cytotoksycznej, o czym świadczy wartość IC_{50} wynosząca ponad 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Jednakże wydłużająca się ekspozycja komórek na fluorek sodu wywołuje bardzo silny efekt cytotoksyczny i powoduje śmierć 50% fibroblastów płucnych po 72 godz. przy stężeniu 78,90 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

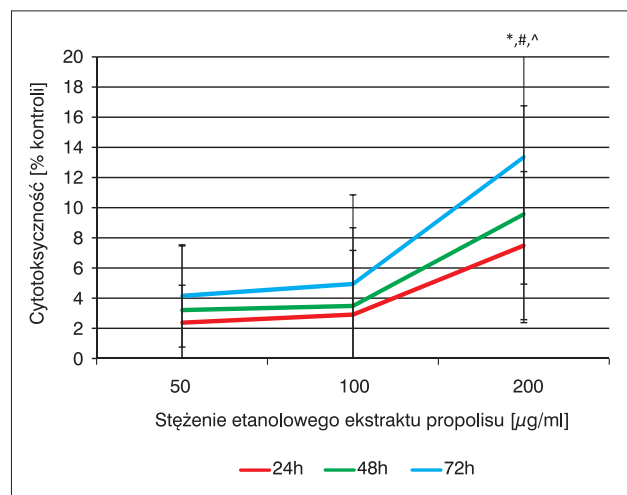
Cytotoksyczność EEP_{DMSO} w stosunku do fibroblastów linii WI-38 przedstawiono na rycinie 2. Wykazano niewielki wzrost odsetek komórek nekrotycznych przy stężeniu 50 i 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ etanolowego ekstraktu propolisu. Nieco wyższe, istotne statystycznie zmiany w odsetku komórek nekrotycznych obserwowano w obecności najwyższego stężenia

Tabela 1. Stężenia fluorku sodu hamujące żywotność 50% komórek (IC_{50}) fibroblastów płucnych linii WI-38 w zależności od czasu ekspozycji.

Czas (godz.)	Wartość IC_{50} NaF ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
24	1402,76
48	117,16
72	78,90



Ryc. 1. Cytotoksyczność fibroblastów płucnych linii WI-38 w zależności od stężenia fluorku sodu i czasu inkubacji badanych komórek. Symbolem ^ oznaczono znamienność statystyczną wyników uzyskanych po 24 godz. inkubacji komórek z NaF, symbolem * po 48 godz., a symbolem # wyniki uzyskane po 72 godz. w stosunku do kontroli.



Ryc. 2. Cytotoksyczność etanolowego ekstraktu propolisu w stosunku do fibroblastów płucnych linii WI-38. Symbolem ^ oznaczono znamienność statystyczną wyników uzyskanych po 24 godz. inkubacji komórek z NaF, symbolem * po 48 godz., a symbolem # wyniki uzyskane po 72 godz. w stosunku do kontroli.

EEP_{DMSO} (200 µg/ml) we wszystkich analizowanych czasach. Na tej podstawie stężenie to zostało wyłączone z dalszych badań.

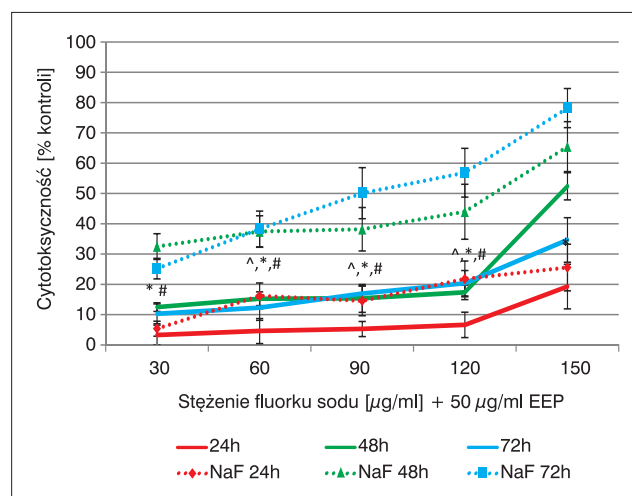
Wpływ EEP na toksyczność fluorku sodu.

Wyniki związane z wpływem EEP w stężeniu 50 µg/ml na cytotoksyczność fluorku sodu w stosunku do badanych komórek fibroblastów WI-38 zostały przedstawione na rycinie 3. Natomiast ochronne działanie wyższej dawki EEP (100 µg/ml) przedstawiono na rycinie 4. Z przeprowadzonych badań wynika, że EEP o stężeniu 50 µg/ml w podłożu niweluje niekorzystne działanie fluorku sodu w stosunku do fibroblastów. Wykazano, że jedynie przy najniższym i najwyższym stężeniu fluorku 30 µg/ml i 150 µg/ml (po 24 godz.) EEP nie wpływa w istotny sposób na cytotoksyczność fluoru w odniesieniu do fibroblastów WI-38. Jednakże po zastosowaniu 100 µg/ml EEP można zaobserwować jego korzystny wpływ na fibroblasty płucne także w najwyższym analizowanym stężeniu NaF.

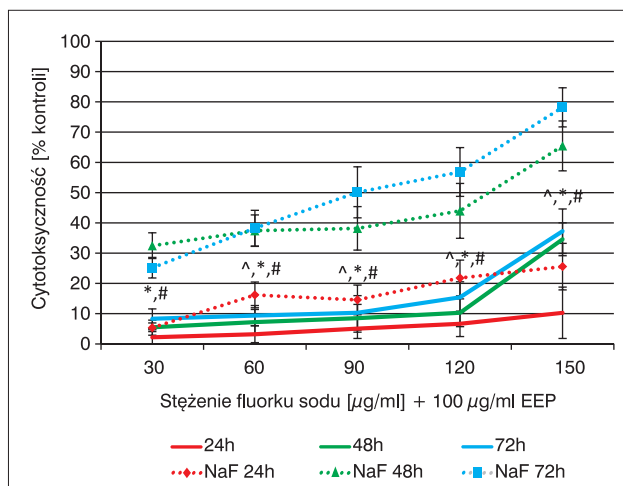
Wyniki oznaczania stopnia cytotoksyczności (test LDH)

Określanie stopnia cytotoksyczności w teście LDH

Ocenę wpływu etanolowego ekstraktu propolisu w stężeniach 50 oraz 100 µg/ml na cytotoksyczne działanie fluorku sodu w stężeniach 30, 60, 90, 120



Ryc. 3. Wpływ EEP w stężeniu 50 µg/ml na cytotoksyczność fluorku sodu w stosunku do fibroblastów płucnych linii WI-38. Symbolem ^ oznaczono znaczącość statystyczną analizy wariacji wyników uzyskanych po 24 godz. inkubacji komórek traktowanych NaF oraz EEP w porównaniu do hodowli prowadzonych w obecności NaF, symbolem * po 48 godz., a symbolem # wyniki uzyskane po 72 godz. Liniami przerywanymi zaznaczono wyniki cytotoksyczności fluorku sodu na fibroblasty płucne.



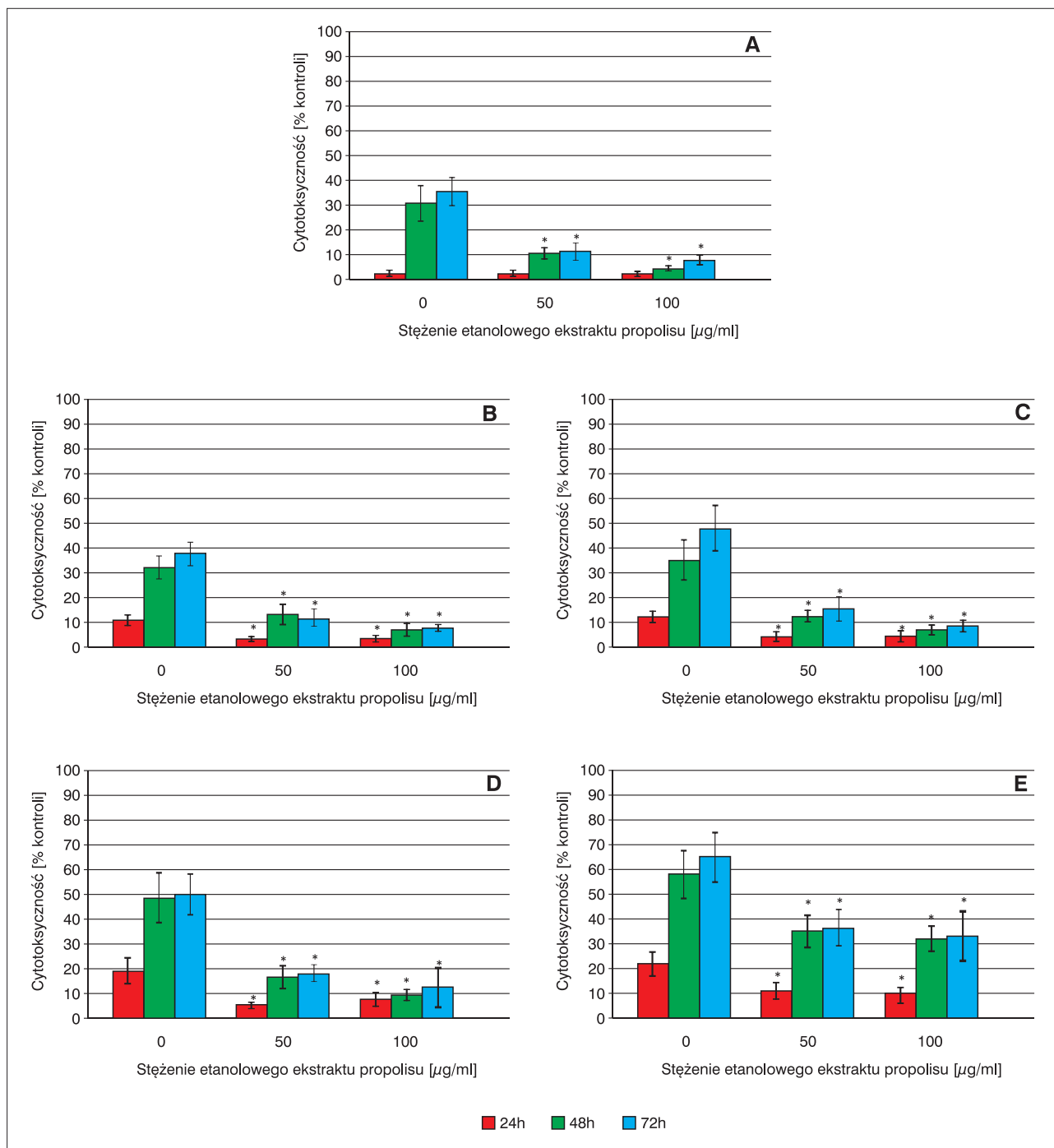
Ryc. 4. Wpływ EEP w stężeniu 100 µg/ml na cytotoksyczność fluorku sodu w stosunku do fibroblastów płucnych linii WI-38. Symbolem ^ oznaczono znaczącość statystyczną analizy wariacji wyników uzyskanych po 24 godz. inkubacji komórek traktowanych NaF oraz EEP w porównaniu do hodowli prowadzonych w obecności NaF, symbolem * po 48 godz., a symbolem # wyniki uzyskane po 72 godz. Liniami przerywanymi zaznaczono wyniki cytotoksyczności fluorku sodu na fibroblasty płucne.

i 150 µg/ml w stosunku do badanych fibroblastów przy użyciu testu LDH przedstawiono na rycinie 5 (A, B, C, D, E). Badania wykazały ochronne działanie EEP w stosunku do NaF. Podanie obu stężeń EEP zmniejszyło uszkodzenie komórek obserwowane przy każdym badanym stężeniu NaF. Obserwowane zmiany wykazywały istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, z wyjątkiem najmniejszego stężenia NaF po 24 godz. ekspozycji.

Dyskusja

W ostatnich latach wzrasta liczba badań poświęconych przeciwutleniaczom, tj. witaminom i różnym związkom niewitaminowym, które mogą obniżać toksyczność fluoru i przeciwdziałać zmianom powstającym w układzie oksydacyjno-redukcyjnym pod wpływem jonów fluorkowych w organizmach żywych. Wyniki przeważającej części eksperymentów wskazują na korzystny wpływ suplementacji substancjami o właściwościach antyoksydacyjnych w zapobieganiu skutkom narażenia na fluor.

W dotychczas przeprowadzonych badaniach doświadczalnych stwierdzono korzystny wpływ witamin E i C na zmiany pojawiające się w błonie śluzowej jamy nosowej oraz na stres oksydacyjny u samic szczurów po narażeniu na fluor. Podanie witamin wraz z fluorem spowodowało obniżenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) oraz wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych; dysmutazy ponadtlenkowej (SOD),



Ryc. 5. Wpływ EEP na cytotoksyczność NaF w stosunku do fibroblastów płucnych linii WI-38 przy użyciu testu LDH. Czas inkubacji 24, 48 i 72 godz. Symbolem * oznaczono znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$. A – cytotoksyczność NaF – 30 µg/ml + EEP; B – cytotoksyczność NaF – 60 µg/ml + EEP; C – cytotoksyczność NaF – 90 µg/ml + EEP; D – cytotoksyczność NaF – 120 µg/ml + EEP; E – cytotoksyczność NaF – 150 µg/ml + EEP.

katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx) w stosunku do aktywności tych enzymów i stężenia MDA w grupie intoksykowanej fluorem (28).

Stawiarska-Pięta i wsp. (29) wykazali korzystny wpływ witamin A i E podawanych łącznie z koenzymem Q w zapobieganiu zmianom morfologicznym

powstającym w płucach i trzustce po intoksykacji szczurów fluorkiem sodu. W innych badaniach prowadzonych na szczurach badacze wykazali korzystny wpływ witaminy E i metioniny na aktywność enzymów przemiany węglowodanowej, enzymów związanych z glutationem, a także zaobserwowali ustąpienie

zmian patomorfologicznych widocznych w wątrobie przy narażeniu zwierząt na jony fluorkowe (30). Błaszczak i wsp. (31) wykazali ochronne działanie witaminy E i metioniny na układ antyoksydacyjny w nerkach szczurów.

Grucka-Mamczar i wsp. (32) opisali korzystny wpływ diety suplementowanej różnymi antyoksydantami: witaminami A, C, E oraz antyoksydantami niewitaminowymi: koenzymem Q i liponianem w różnych kombinacjach, na stężenie MDA w surowicy krwi szczurów narażonych na fluorek sodu w dawce 10 mg/kg m.c. w czasie 24 godz. Najlepsze działanie ochronne zaobserwowano po podaniu diety zawierającej koenzym Q oraz witaminy A i E.

Natomiast Kaushik i wsp. (33) opisali ochronny wpływ suplementacji diety spiruliną – produktem bogatym w antyoksydanty, składniki mineralne i białko. Stwierdzono korzystne zmiany parametrów układu antyoksydacyjnego (wzrost aktywności GR i GST) oraz korzystny wpływ na procesy peroksydacji we krwi szczurów narażonych na jony fluorkowe. Badacze wiążą to działanie z właściwościami β -karotenu zawartego w tym produkcie.

Z kolei Chawla i wsp. (34) w eksperymencie na myszach wykazali korzystny wpływ melatoniny w odniesieniu do hepatotoksyczności indukowanej fluoridem sodu.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że fluorek sodu wpływa cytotoksycznie na fibroblasty płucne linii WI-38, w zależności od jego stężenia w podłożu i czasu ekspozycji. Ponadto wykazano, że etanolowy ekstrakt propolisu (EEP) nie wykazuje aktywności cytotoksycznej w stosunku do badanych komórek w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast niską, ale istotną statystycznie, cytotoksyczność wykazuje w najwyższym użytym stężeniu EEP – 200 $\mu\text{g/ml}$. Wykazane ochronne działanie EEP, nie było jednak w pełni skuteczne w ochronie przed działaniem cytotoksycznym fluorku sodu w stosunku do badanych fibroblastów. Wpływ tego działania był zależny od stężenia propolisu i czasu trwania hodowli. Wyższe stężenie EEP wykazywało silniejszy efekt protekcyjny w stosunku do badanej linii fibroblastów narażonych na badane stężenia fluorku w podłożu. Jednakże zastosowane dawki propolisu wykazywały większą skuteczność w obecności niższych stężeń fluorku sodu, natomiast zastosowanie ich w obecności najwyższego stężenia fluorku było mniej skuteczne.

Uzyskane wyniki, dotyczące wpływu propolisu *in vitro* na toksyczność fluorku sodu, korelują z wynikami badań uzyskanymi w badaniach *in vivo*. W badaniach eksperymentalnych wykazano korzystny

wpływ propolisu (35, 36) lub związków fenolowych (37, 38), które występują w różnych owocach na toksyczność fluoru.

Panneerselvam i wsp. (37) zaobserwowali korzystny wpływ kwasu ferulowego, związku fenolowego powszechnie występującego w owocach cytrusowych, na obniżenie aktywności markerów uszkodzenia wątroby (ALT, AST, GGTP) w surowicy krwi szczurów, a także w przeciwdziałaniu zmianom morfologicznym w tym narządzie, powstałym po intoksykacji zwierząt dawką 25 mg/l NaF.

Podobnie Nabavi i wsp. (38) w badaniach *in vivo* stwierdzili działanie ochronne kwercetyny na tkankę wątrobową szczurów intoksykowanych roztworem fluorku sodu w dawce 600 ppm. Zaobserwowali oni także przywracanie równowagi w układzie oksydacyjno-redukcyjnym w wątrobie zwierząt po podaniu kwercetyny w dawce 10 i 20 mg/kg.

Fatma i wsp. (35) zbadali właściwości antyoksydacyjne propolisu na toksyczność fluoru *in vivo*. Badacze wykazali zmniejszenie działania toksycznego fluoru na szczury pod jego wpływem. Wykazali także korzystny wpływ propolisu na oznaczane parametry biochemiczne: aktywność fosfatazy alkalicznej, stężenie mocznika, kreatyniny i białka. Ponadto zaobserwowali wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej zwierząt (znaczny wzrost aktywności SOD, podwyższenie poziomu GSH we krwi i mózgu) oraz obniżenie procesów oksydacyjnych (spadek poziomu MDA).

Ponadto Eraslan i wsp. (36) w badaniach na szczurach wykazali korzystny wpływ propolisu na parametry układu oksydacyjno-redukcyjnego (MDA, SOD) oraz na niektóre parametry biochemiczne, jednak to działanie nie było w stanie w pełni skutecznie wyeliminować zmian wynikających z toksyczności fluoru. Zarówno zmiany parametrów lipidowych, jak i aktywności transaminaz nie były statystycznie istotne.

Korzystne działanie propolisu odnotowano również w odniesieniu do innych ksenobiotyków. W badaniach na szczurach wykazano korzystny wpływ propolisu (100 mg/kg m.c./dobę) na parametry stresu oksydacyjnego (stężenie MDA) oraz na aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx) we krwi, wątrobie, nerkach i mózgu u zwierząt narażonych na pestycydy (Propetamphos) (39).

Alsayed Ali Mahran i wsp. (40) w badaniach dotyczących wpływu propolisu na płodność u szczurów narażonych na chlorek glinu wykazali, że stosowanie tego produktu zapobiega zmianom pojawiającym się

pod postacią uszkodzeń kanalików nasiennych, komórek rozrodczych oraz komórek Sertoliego.

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zastosowano propolis, który w swoim składzie zawierał około 50% polifenoli. Zawartość procentowa flawonów i flawonoli oraz flawanonów i dihydroflawonoli wynosiła łącznie około 10,5%. Wśród kwasów fenolowych o aktywności antyoksydacyjnej w badanym propolisie występował kwas kawowy, kwas galusowy, kwas ferulowy oraz kwas kumarowy (32). Wydaje się zatem, że działanie ochronne propolisu użytego w badaniach w odniesieniu do cytotoksyczności fluorku sodu, związane jest przede wszystkim z obecnością związków polifenolowych o działaniu antyoksydacyjnym, zarówno takich, których działanie polega na hamowaniu reakcji utleniania, jak i takich, które usuwają wolne rodniki tlenowe. Dlatego dalsze badania związane z określeniem przeciwutleniającego działania propolisu są konieczne w celu określenia optymalnej dawki, przy której będą obserwowane maksymalne korzyści jego wpływu ochronnego.

Przeprowadzone badania wskazują na możliwość wykorzystania EEP wszędzie tam, gdzie istnieje zagrożenie narażenia ludzi na związki fluoru.

Wnioski

1. Fluorek sodu wpływa niekorzystnie na fibroblasty płucne linii WI-38 poprzez działanie cytotoksyczne zależne od stężenia i czasu ekspozycji.
2. Etanolowy ekstrakt badanego propolisu (EEP) nie wykazuje aktywności cytotoksycznej w stosunku do fibroblastów płucnych w stężeniach 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$.
3. Wykazano ochronne działanie EEP wobec cytotoksycznego działania fluorku sodu na fibroblasty płucne linii WI-38.

Piśmiennictwo

1. Hordyjewska A, Pasternak K. Wpływ fluoru na organizm człowieka. *J Elementol* 2004; 9(4):883-7. 2. Perumal E, Paul V, Govindarajan V i wsp. A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol Lett* 2013; 223:236-51. 3. Chinoy NJ. Fluoride in the environment. (red. Chlubek D) *Fluoride in medicine, biology and toxicology*. Borgis, Warszawa 2003; 5-22. 4. Adamek E, Pawłowska-Góral K, Bober K. *In vitro* and *in vivo* effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin* 2005; 51(2):69-85. 5. Lu Y, Sun Z, Wu LN i wsp. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride* 2000; 33:74-8. 6. Kumar N, Sood S, Arora B i wsp. Effect of duration of fluoride exposure on the reproductive system in male rabbits *J Hum Reprod Sci* 2010; 3(3):148-52. 7. Zhang M, Wang A, Xia T i wsp. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF- κ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett* 2008; 179:1-5. 8. Karube H, Nishitai G, Inageda K i wsp. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res* 2009; 88:461-5. 9. Lee

JH, Jung JY, Jeong YJ i wsp. Involvement of both mitochondrial and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblast. *Toxicol* 2008; 243:340-7. 10. Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH i wsp. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14:383-9. 11. Yan X, Yan X, Morrison A i wsp. Fluoride induces apoptosis and alters collagen I expression in rat osteoblasts. *Toxicol Lett* 2011; 200: 33-138. 12. Yan X, Feng C, Chen Q i wsp. Effects of sodium fluoride treatment *in vitro* on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts. *Arch Toxicol* 2009; 83:451-8. 13. Hirano S, Ando M. Fluoride mediates apoptosis in osteosarcoma UMR 106 and its cytotoxicity depends on the pH. *Arch Toxicol* 1997; 72:52-8. 14. Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Fluoride induces apoptosis by caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Arch Toxicol* 2000; 74:226-30. 15. Chinoy NJ. Fluoride stress and antioxidant defence system. *Fluoride* 2003; 36:138-41. 16. Chlubek D. Fluoride and oxidative stress. *Fluoride* 2003; 36(4):217-28. 17. Wang AG, Xia T, Chu QL i wsp. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes. *Biomed Environ Sci* 2004; 17:217-22. 18. Agalakova NI, Gusev GP. Fluoride induces oxidative stress and ATP depletion in the rat erythrocytes *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012, 34:334-7. 19. Liu H, Sun J, Zahn Z i wsp. Fluoride-induced oxidative stress in three-dimensional culture of OS732 cells and rats. *Biol Trace Elem Res* 2010; 143:446-56. 20. Jin X, Xu H, Shi H i wsp. Fluoride-induced oxidative stress of osteoblasts and protective effects of baicalein against fluoride toxicity. *Biol Trace Elem Res* 2007; 116:81-9. 21. Velazquez C, Navarro M, Acosta A i wsp. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl Microbiol* 2007; 103:1747-56. 22. 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. 23. 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. 24. 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. 25. da Silva-Frozza CO, Garcia CS, Gambato G i wsp. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 2012; 52C:137-42. 26. Kurek-Górecka A. Ocena właściwości antyoksydacyjnych wybranych frakcji propolisu. *Rozprawa doktorska*. Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice 2008. 27. Kubina K, Kabała-Dzik A, Bielec B i wsp. Ocena właściwości cytotoksycznych etanolowego ekstraktu z propolisu w stosunku do komórek raka okrężnicy HCT 116. *Post Fitoter* 2013; 2:76-84. 28. Guney M, Oral B, Demirin H i wsp. Protective effects of vitamins C and E against endometria damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:467-74. 29. Stawiarska-Pięta B, Paszczela A, Grucka-Mamczar E i wsp. The effect of antioxidative vitamins A and E and coenzyme Q on the morphological picture of the lungs and pancreata of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem Toxicol* 2009; 47:2544-50. 30. Stawiarska-Pięta B, Bielec B, Birkner K i wsp. The influence of vitamin E and methionine on the activity of enzymes and the morphological picture of liver of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:972-8. 31. Błaszczczyk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S i wsp. Influence of methionine upon the activity of antioxidative enzymes in the kidney of rats expose to sodium fluoride. *Biol Trace Elem Res* 2010; 133(1):60-70. 32. Grucka-Mamczar E, Birkner E, Błaszczczyk I i wsp. The influence of sodium fluoride and antioxidants on the concentration of malondialdehyde in rat blood plasma. *Fluo-*

- ride 2009; 2:101-4. **33.** Kaushik T, Shyam R, Vat P i wsp. Glutathione metabolism in rats expose to high fluoride water and effect of spirulina treatment. *Fluoride* 2001; 34:132-8. **34.** Chawla SL, Yadav R, Shah D i wsp. Protective action of melatonin against fluoride-induced hepatotoxicity in adult female mice. *Fluoride* 2008; 41:44-51. **35.** Panneerselvam L, Subbiah K, Arumugam A i wsp. Ferulic acid modulates fluoride-induced oxidative hepatotoxicity in male Wistar rats. *Biol Trace Elem Res* 2012; 151(1):85-91. **36.** Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami S i wsp. *In vivo* protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem* 2012; 132(2):931-5. **37.** Fatma A. Khalil, Nora M, El-Sheikh. The effects of dietary Egyptian propolis and bee pollen supplementation against toxicity of sodium fluoride in rats. *J Am Sci* 2010; 6(11):310-6. **38.** Eraslan G, Kangbur M, Silici S. Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium fluoride. *Pesticide Biochem Physiol* 2007; 88:273-83. **39.** Kanbur M, Eraslan G, Silici S. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(3):909-15. **40.** Al-Sayeda A. Newairy, Afrah F. Salama, Hend M i wsp. Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(6):1093-8.

otrzymano/received: 13.01.2015
zaakceptowano/accepted: 30.01.2015

Adres/address:

*dr hab. n. med. Barbara Stawiarska-Pięta
Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
41-200 Sosnowiec, ul. Ostrogórska 30
tel. +48 (32) 364-13-50/51
e-mail: bpieta@sum.edu.pl