

*Elżbieta Hołderna-Kędzia, Bogdan Kędzia

Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. 3. Związki o różnej strukturze chemicznej

Anticancerogenic activity of some components of propolis. Part 3. Compounds with different chemical structures

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań
Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Małgorzata Łochyńska, prof. IWNiRZ

SUMMARY

The paper reviews the research on the antitumor activity of propolis components belonging to different, previously (Part 1 and 2), not discussed chemical groups. The *in vitro* (human and animal cancer cell lines) and *in vivo* tests performed showed differentiated cytotoxic activity of the tested compounds (IC_{50} from 2 to > 100.0 g/ml), including weak, moderate or strong ($IC_{50} = 4.0 \mu\text{g/ml}$). The strongest cytotoxic activity was shown by prenylated aromatic acids (artepillin C), isoflavones (mucronulatol) and prenylated benzophenones (nemorosan and plukenethione). The studies also showed a reduction in the degree of neoplastic metastases to various organs under the influence of the test substances (83.0%), as well as inhibition of neoplastic cells (90%) compared to control cultures.

Keywords: propolis, chemical compounds, anti-cancer effect, cytostatic effect, tumor cell lines, apoptosis

STRESZCZENIE

W referacie dokonano przeglądu badań nad działaniem przeciwnowotworowym składników propolisu, należących do różnych, wcześniej (cz. 1 i 2) nieomawianych grup chemicznych. Przeprowadzone testy *in vitro* (linie komórek nowotworowych ludzkich i zwierzęcych) i *in vivo* wykazały zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną badanych związków (IC_{50} od 2 do > 100,0 g/ml), w tym słabą, umiarkowaną lub silną ($IC_{50} = 4,0 \mu\text{g/ml}$). Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazywały prenylowane kwasy aromatyczne (artepillina C), izoflawony (mukronulatol) oraz prenylowane benzofenony (nemorosan i plukenetion). Badania wykazały również obniżenie stopnia przerzutów nowotworowych do różnych narządów pod wpływem badanych substancji (83,0%), a także hamowanie komórek nowotworowych (90%) w porównaniu z hodowlami kontrolnymi.

Słowa kluczowe: propolis, związki chemiczne, działanie przeciwnowotworowe, działanie cytostaticzne, linie komórek nowotworowych, apoptoza

Wstęp

We wcześniejszych opracowaniach (cz. 1 i 2) dokonano przeglądu danych piśmiennictwa dotyczących przeciwnowotworowego działania składników propolisu, takich jak ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE) i związki flawonoidowe. W części 1 wykazano, że CAPE jest jednym z najważniejszych związków decydujących o właściwościach przeciwnowotworowych propolisu i jego ekstraktów. Badania prowadzone na liniach komórkowych nowotworów ludzkich i zwierzęcych *in vitro* i *in vivo* wykazały wysoką cytotoksyczność tego związku, jak również działanie ochronne wobec substancji karcynogennej – azoksymetanu i zmniejszające przerzuty nowotworowe

do innych narządów, m.in. na drodze hamowania namnażania komórek i stymulowania apoptozy (1). W części 2 omówiono działanie związków flawonoidowych wyodrębnionych z propolisu różnego pochodzenia (krajowego i z innych rejonów świata) na modelu komórek nowotworowych ludzkich i zwierzęcych (*in vitro* i *in vivo*). Badane związki flawonoidowe wykazywały różną siłę działania cytotoksycznego wobec zastosowanych linii komórkowych. Wysoką aktywność cytotoksyczną wykazały związki flawonoidowe pochodzące z propolisu brazylijskiego, flawonoidy prenylowane z propolisu tajwańskiego (IC_{50} odpowiednio 3,5 i 7,5 $\mu\text{g/ml}$) oraz propoliny C i D (IC_{50} odpowiednio 3,4 i 73,6 $\mu\text{g/ml}$) (2).

Dane piśmiennictwa wskazują, że właściwości biologiczne propolisu, w tym antybiotyczne, immunostymulujące, przeciwwzapalne, przeciwtleniające i przeciwnowotworowe, warunkują także inne składniki biologicznie aktywne obecne w ekstraktach etanolowych lub wodnych. Ekstrakt wodny propolisu (WSDP) zawiera m.in. kwas kawowy (6,7%) o aktywności przeciwnowotworowej (3). Według Greenway (4) w propolisie znajduje się ok. 25% mieszaniny kwasu kawowego (CA) i jego estru fenyloetylowego (CAPE), omówionego we wcześniejszej pracy (1).

Antymetastatyczna aktywność kwasu kawowego i WSDP wiąże się głównie z ich właściwościami immunomodulującymi, aktywnością cytotoksyczną oraz zdolnością do indukowania apoptozy lub nekrozy komórek.

Kwasy aromatyczne

Wyniki badań (5, 7) przedstawione w tabeli 1 wskazują, że kwasy aromatyczne, łącznie z kwasem cynamonowym i kawowym, charakteryzują się słabym działaniem przeciwnowotworowym *in vitro* zarówno wobec komórek nowotworów zwierzęcych, jak i ludzkich. W porównaniu ze związkami flawonoidowymi wykazywały one prawie dwukrotnie niższą aktywność cytostatyczną.

Z badań Szliszki i wsp. (8) dotyczących kwasów aromatycznych występujących w ekstrakcie etanolowym z propolisu krajowego wynika, że związki te charakteryzują się umiarkowaną aktywnością cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych Hela, prawie dwukrotnie niższą w porównaniu ze związkami flawonoidowymi (tab. 2). Badane kwasy aromatyczne: cynamonowy, *o*-, *m*- i *p*-kumarowy oraz kawowy obniżały liczbę komórek ludzkiego nowotworu szyjki macicy Hela od 5,0 do 7,9%, natomiast w obecności czynnika wzmagającego apoptozę (TRAIL) obniżenie liczby żywych komórek nowotworowych było około 4-krotnie wyższe (20,1-29,3%).

Działanie przeciwnowotworowe kwasu kawowego w warunkach *in vivo* okazało się bardziej korzystne. Oršolič i wsp. (9) wykazali, że podawanie myszom

tego związku w ilości 50 mg/kg m.c. drogą pokarmową na 15, 10 i 5 dni przed wszczepieniem ludzkiego nowotworu sutka MCA obniżało o 70,6% przerzuty tego nowotworu do płuc badanych zwierząt.

W innym doświadczeniu Oršolič i wsp. (10) stwierdzili, że podskórne podawanie myszom kwasu kawowego (50 mg/kg raz dziennie) przedłużało życie myszy zaszczepionych nowotworem MCA o 29,1%.

W kolejnych badaniach ten sam zespół (11) podawał myszom kwas kawowy dojelitowo w dawce 150 mg/kg m.c. raz dziennie. Zaobserwowano, że podawanie tego związku na 15, 10 i 5 dni przed wszczepieniem komórek nowotworowych, nawet po 5 tyg. po zabiegu, w 64,1% hamowało u myszy rozwój wszczepionego nowotworu MCA. Lepsze efekty uzyskano, kiedy kwas kawowy w ilości 150 mg/kg m.c. podawano drogą jelitową raz dziennie po 2, 7 i 12 dniach od wszczepienia myszom komórek nowotworowych. Po 5 tyg. od zakończenia podawania kwasu kawowego zahamowanie rozwoju nowotworu MCA w organizmie myszy wynosiło 90%.

Prenylowane kwasy aromatyczne

Banskota i wsp. (5) z frakcji octanu etylu otrzymanej z ekstraktu metanolowego z propolisu brazylijskiego wyizolowali 3 prenylowane kwasy aromatyczne, w tym

Tab. 2. Aktywność cytotoksyczna kwasów aromatycznych występujących w ekstrakcie etanolowym z propolisu krajowego (wg 8)

Nazwa związku	Aktywność cytotoksyczna (%) ¹ wobec komórek nowotworowych	
	Kwas aromatyczny (50 μ mol)	Kwas aromatyczny (50 μ mol) + TRAIL (100 ng/ml)
Kwas cynamonowy	5,0	26,3
Kwas <i>o</i> -kumarowy	5,2	26,8
Kwas <i>m</i> -kumarowy	5,8	20,1
Kwas <i>p</i> -kumarowy	7,9	29,3
Kwas kawowy	5,6	24,7

¹Obniżenie liczby komórek ludzkiego nowotworu szyjki macicy Hela w procentach

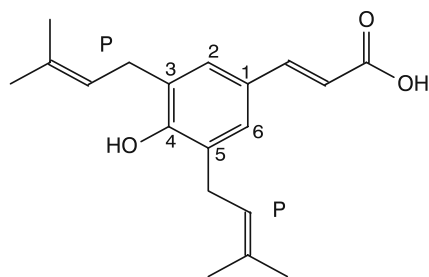
Tab. 1. Aktywność cytostatyczna kwasów aromatycznych wobec mysich i ludzkich komórek nowotworowych (wg 5, 7)

Badane związki	Aktywność cytostatyczna (ED ₅₀ , μ g/ml)				
	Nowotwory mysie		Nowotwory ludzkie		
	26-L5	B16-BL6	HT-1080	A549	Hela
Kwas izoferulowy	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Kwas 3,4-dimetoksycynamonowy	> 450	> 450	> 450	> 450	> 450
Kwas cynamonowy	> 650	> 200	> 200	> 200	> 200
Kwas ferulowy	> 500	> 200	> 200	> 200	> 200
Kwas kawowy	165	> 200	> 200	> 200	> 200

kwasy 3,5-diprenylo-4-hydroksycynamonowy (artepillina C) (ryc. 1) i kwas 4-dihydroksycynamyloksy-3-prenylocynamonowy. Ich aktywność cytotoksyczna (IC_{50}) wobec komórek ludzkiego włókniakoraka HT-1080 wynosiła odpowiednio 45,5 i 25,9 $\mu\text{g/ml}$, a wobec komórek mysiego raka okrężnicy L5-29 odpowiednio 59,3 i 77,9 $\mu\text{g/ml}$.

Matsuno i wsp. (12) stwierdzili, że artepillina C w stężeniu 150 $\mu\text{g/ml}$ hamuje (od 40,2 do 83,0%) rozwój komórek nowotworów ludzkich (tab. 3). Najsilniej związek ten hamował komórki nowotworu sutka MX-1 i nowotworu okrężnicy Co-6 odpowiednio w 83,0 i 81,1% w porównaniu z hodowlami kontrolnymi.

Kimoto i wsp. (13, 14) badali działanie przeciwnowotworowe artepilliny C u myszy poddawanych karcynogennemu działaniu nitrylotrioctanu żelaza, wywołującego nowotwory nerek i płuc. Wyniki badań (tab. 4) wskazują, że po 12 miesiącach podawania substancji karcynogennej łącznie z artepilliną C nie wystąpiły u myszy nowotwory. Natomiast u zwierząt, które otrzymywały tylko karcynogen, u 50% obserwowano guzy nerek i guzy przednowotworowe, a u 33% nowotwór nerek. Podobnie, karcynogen spowodował gruczolaka płuc u 16,5% zwierząt i nowotwór płuc u 50%. Co prawda u 92% zwierząt otrzymujących artepillinę C



P – grupa prenylowa

Ryc. 1. Struktura chemiczna artepilliny C (kwas 3,5-diprenylo-4-hydroksycynamonowy) (wg 5)

obserwowano łagodne guzy nerek i u 33% zwierząt gruczolaki płuc, ale nie przekształciły się one w formy złośliwe. Artepillina C w 100% zabezpieczała zwierzęta przed powstaniem nowotworów nerek i płuc.

Estry kwasów aromatycznych

Grunberger i wsp. (15) jako pierwsi zwrócili uwagę na to, że ester fenyletylowy kwasu kawowego (ang. *caffeic acid phenetyl ester* – CAPE), zwany także estringiem fenetylowym kwasu kawowego, jest jednym z najważniejszych związków odpowiedzialnych za przeciwnowotworowe działanie ekstraktów propolisowych. Jego działanie zostało omówione w części 1 opracowania dotyczącego tego zagadnienia (1).

Rao i wsp. (16) przebadali działanie cytotoksyczne niektórych estrów kwasu kawowego występujących w ekstraktach propolisowych (ryc. 2), wobec komórek ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy HT-29 (tab. 5) i wykazali wysoką aktywność estrów: fenetylowego kwasu kawowego (PEC, CAPE) i fenetylowego kwasu dimetylokawowego (PEDMC). Hamowały one rozwój komórek wymienionego nowotworu odpowiednio w stężeniach 30 i 20 μmol ; ester metyloowy kwasu kawowego okazał się w tych warunkach nieaktywny.

W innym eksperymencie Rao i wsp. (17) karmili szczury paszą standardową z dodatkiem 500 $\mu\text{g/g}$ estrów PEMC i PEDMC (ryc. 2) przez 2 tygodnie, a następnie podawali im karcynogeny azoksymetan

Tab. 3. Aktywność cytotoksyczna artepilliny C wobec przeszczepialnych nowotworów ludzkich (wg 12)

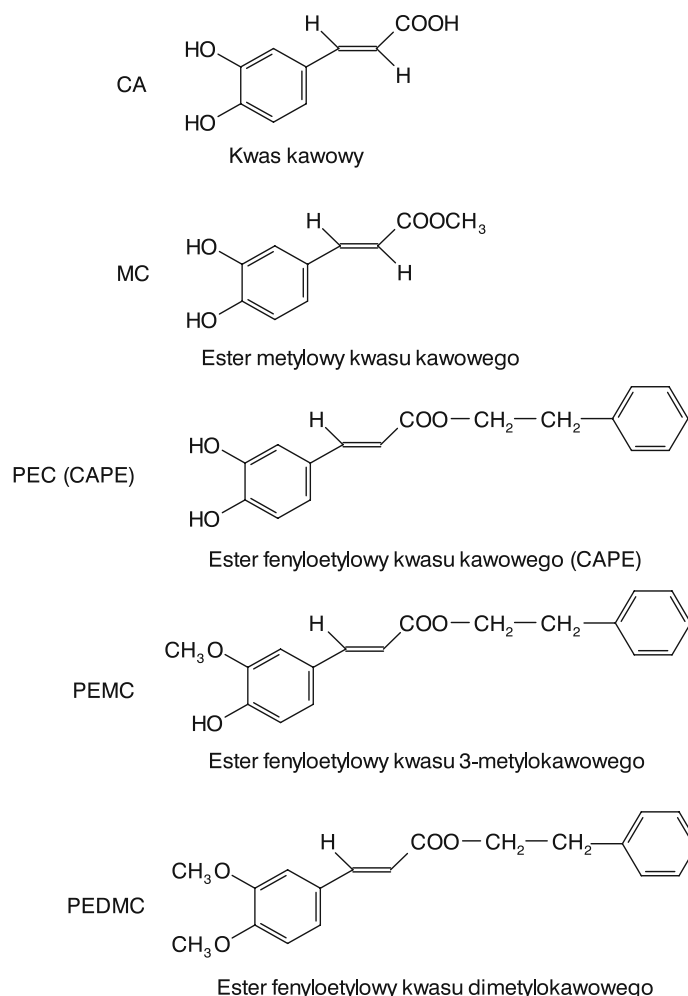
Komórki linii nowotworowych	Stopień zahamowania rozwoju komórek nowotworowych (%) pod wpływem artepilliny C (150 $\mu\text{g/ml}$)
Nowotwór sutka MX-1	83,0
Nowotwór okrężnicy Co-6	81,1
Nowotwór okrężnicy Co-3	63,8
Nowotwór żołądka H-111	40,2

Tab. 4. Działanie przeciwnowotworowe artepilliny C u myszy poddawanych karcynogennemu działaniu nitrylotrioctanu żelaza (wg 13 i 14)

Substancje użyte w badaniach	Liczba myszy	Zmiany wywołane przez substancję karcynogeną			
		Łagodne guzy nerek	Guzy przedrakowe nerek	Gruczolaki płuc	Nowotwory nerek i płuc
Fe-NTA-karcynogen nerek ¹	12 (100)	6 (50)	6 (50)		4 (33)
Artepillina C ²	12 (100)	11 (92)	0		0
Fe-NTA-karcynogen płuc ¹	12 (100)			2 (16,5)	6 (50)
Artepillina C ²	12 (100)			4 (33)	0

¹Nitrylotrioctan żelaza: 10 mg Fe/kg m.c./dzień, dożylnie 2 razy w tygodniu przez 8 tygodni

²Artepillina C: podawanie drogą pokarmową 2 razy dziennie przez 5 dni w tygodniu, w dawce 100 $\mu\text{g/mysz}$



Ryc. 2. Budowa chemiczna estrów kwasu kawowego (wg 16)

Tab. 5. Aktywność cytotoksyczna estrów kwasu kawowego wobec komórek ludzkiego gruczolaka okrężnicy HT-29 (wg 16)

Estry kwasu kawowego	Stężenie hamujące rozwój komórek gruczolaka okrężnicy HT-29 (μmol)
MC	> 150
PEC (CAPE)	30
PEDMC	20

raz w tygodniu (15 mg/kg m.c.) przez 2 kolejne tygodnie. Po kolejnych 5 tyg. karmienia zwierząt paszą z dodatkiem estrów kwasu kawowego oceniano liczbę powstałych nadżerek okrężnicy o charakterze nowotworowym. Wyniki badań (tab. 6) wskazują, że podawanie szczurom paszy z dodatkiem estrów kwasu kawowego zabezpieczało je przed rozwojem nowotworu okrężnicy. W przypadku estru fenetylowego kwasu 3-metylokawowego (PEMC) i fenyletylowego

Tab. 6. Wpływ estrów kwasu kawowego na powstawanie nadżerek okrężnicy typu nowotworowego indukowanych azoksymetanem (wg 17)

Grupy zwierząt doświadczalnych	Liczba nadżerek okrężnicy o charakterze nowotworowym
Kontrola (AOM) ¹	123 (0) ³
AOM + PEMC ²	22 (2,1)
AOM + PEDMC ²	23 (81,3)

¹AOM – azoksymetan

²PEMC, PEDMC (ryc. 2)

³W nawiasach podano obniżenie liczby nadżerek okrężnicy w porównaniu z kontrolą

kwasu dimetylokawowego (PEDMC) liczba nadżerek obniżyła się odpowiednio o 82,1 i 81,3% w porównaniu z kontrolą (azoksymetan).

Dalsze badania Rao i wsp. (18) wykazały, że podawanie szczurom estru fenetylowego kwasu 3-metylokawowego (PEMC) w paszy w ilości 750 $\mu\text{g/g}$

zabezpieczało jelito cienkie i okrężnicę tych zwierząt przed powstaniem nowotworu w 57,4% w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, którym podawano tylko związki karcynogeny – azoksymetan.

Banskota i wsp. (5) oceniali cytotoksyczne działanie estrów kwasu kawowego na komórki nowotworowe ludzkie i mysie. Stwierdzili oni, że ester cynamylowy kwasu kawowego, jak również ester benzylový kwasu kawowego wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną (tab. 7), silniej na komórki nowotworów mysich: 26-L5 i B16-BL6 (EC_{50} od 0,1 do 3,2 μmol).

Badania Usia i wsp. (7) obejmowały aktywność cytotoksyczną estru benzylový kwasu ferulowego i estru benzylový kwasu kawowego (tab. 8). Jako kontroli użyto 5-fluorouracylu. Odnotowano

słabe działanie estru benzylový kwasu kawowego (EC_{50} 1,0-35,0 μmol) i najsłabsze estru benzylový kwasu ferulowego (EC_{50} 46,4-92,8 μmol).

Alkohole, glicerole i aldehydy

Banskota i wsp. (5, 6) badali aktywność trzech alkoholi aromatycznych, dwóch gliceroli i jednego aldehydu aromatycznego (tab. 9) wobec komórek ludzkiego włókniakomięsaka HT-1080 i gruczolakoraka płuc A549 oraz komórek mysiego raka okrężnicy 26-L5 i czerniaka B16-BL6. Alkohole aromatyczne i glicerole wykazywały niską aktywność cytotoksyczną (IC_{50} od 44,0 do powyżej 200 μmol), a aldehyd koniferylový (ryc. 3) wyizolowany z ekstraktu metanolowego z propolisu brazylijskiego

Tab. 7. Cytotoksyczne działanie estrów kwasu kawowego na komórki nowotworów ludzkich i mysich (wg 5)

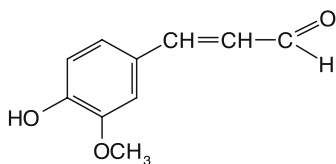
Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (EC_{50} , μmol)			
	Nowotwory ludzkie		Nowotwory mysie	
	HT-1080	A-549	26-L5	B16-BL6
Ester cynamylowy kwasu kawowego	9,5	18,9	0,1	1,9
Ester benzylový kwasu kawowego	13,3	18,9	0,3	2,0

Tab. 8. Działanie przeciwnowotworowe estrów kwasów aromatycznych na komórki nowotworów ludzkich i mysich (wg 7)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (EC_{50} , μmol)				
	Nowotwory ludzkie			Nowotwory mysie	
	HT-1080	A-549	Hela	26-L5	B16-BL6
Ester benzylový kwasu ferulowego	46,7	92,8	51,1	46,4	63,7
Ester benzylový kwasu kawowego	9,7	35,0	2,3	1,0	9,8
5-Fluorouracyl	1,4	3,6	0,2	0,3	1,2

Tab. 9. Cytotoksyczne działanie alkoholi, gliceroli i aldehydów na komórki nowotworów ludzkich i mysich (wg 5 i 6)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (ED_{50} , $\mu\text{g/ml}$)			
	Nowotwory ludzkie		Nowotwory mysie	
	HT-1080	A-549	26-L5	B16-BL6
Alkohole aromatyczne				
Alkohol benzylový	> 200	> 200	> 200	> 200
Alkohol fenylový	> 200	> 200	> 200	> 200
Alkohol cynamonowy	> 200	> 200	47,8	44,0
Glicerole				
2-Acetylo-1,3-dikumaryloglicerol	83,3	72,3	85,9	81,9
2-Acetylo-1-kumarylo-3-feruloglicerol	80,5	> 200	75,5	66,0
Aldehydy aromatyczne				
Aldehyd koniferylový	4,1		10,4	



Ryc. 3. Wzór chemiczny aldehydu koniferylowego (wg 5)

– stosunkowo wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek ludzkiego włókniakomięsa HT-1080 ($IC_{50} = 4,0 \mu\text{mol}$) i mysiego raka okrężnicy 26-L5 ($IC_{50} = 10,4 \mu\text{mol}$) (tab. 9).

Chromany i chromeny

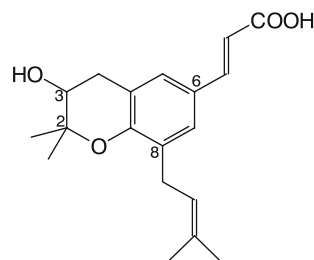
Pochodna chromanu i pochodna chromenu (ryc. 4), wyizolowane z ekstraktu metanolowego z propolisu brazylijskiego, charakteryzowały się niską aktywnością cytotoksyczną (ED_{50} od 46,9 do 77,1 $\mu\text{g/ml}$) (tab. 10) wobec użytych w doświadczeniu komórek nowotworowych ludzkich i mysich (5).

Diterpeny

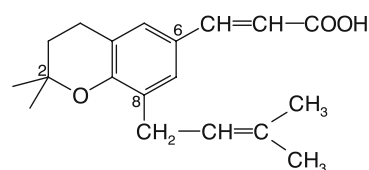
Badano aktywność cytotoksyczną diterpenów izolowanych z ekstraktów metanolowych z propolisu brazylijskiego. Matsuno i wsp. (12) wyodrębnili dwie pochodne klerodanu, w tym kwas 13Z-symforetikulowy (ryc. 5), które badano wobec 3 linii komórkowych nowotworów ludzkich (tab. 11). Banskota i wsp. (5) badaniom na aktywność cytotoksyczną poddali 5 pochodnych kwasu kupressowego (ryc. 5) wobec 2 linii komórek nowotworowych (tab. 11). Związki diterpenowe charakteryzowały się słabym działaniem; pochodne klerodanu działały na badane komórki nowotworowe w zakresie stężeń (ED_{50}) od 18 do 23 $\mu\text{g/ml}$, a pochodne kwasu kupressowego w zakresie stężeń (ED_{50}) od 63,5 do > 100 $\mu\text{g/ml}$ (tab. 11).

Triterpeny

Li i wsp. (20) określili aktywność cytostatyczną związków triterpenowych pochodnych cykloartanu (ryc. 6) wyizolowanych z ekstraktu metanolowego

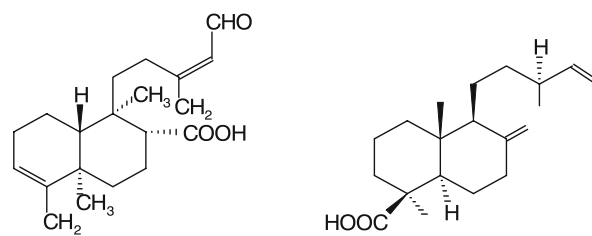


Kwas 3-hydroksy-2,2-dimetylo-8-prenylochromano-6-propenowy



Kwas 2,2-dimetylo-8-prenylochromeno-6-propenowy

Ryc. 4. Pochodne chromanu i chromenu wyizolowane z propolisu brazylijskiego (wg 5)



Kwas 13Z-symforetikulowy

Kwas kupressowy

Ryc. 5. Budowa chemiczna diterpenów występujących w propolisie brazylijskim (wg 5 i 19)

z propolisu birmańskiego. Badania prowadzono na 6 liniach komórek nowotworowych: 3 ludzkich i 3 mysich. Poza komórkami nowotworowymi opisanymi w tabeli 12, użyto również mysiego raka płuc Lewisa (LLC). Spośród 13 związków triterpenowych

Tab. 10. Aktywność cytostatyczna pochodnych chromanu i chromenu wyizolowanych z propolisu brazylijskiego (wg 5)

Badane związki	Aktywność cytostatyczna (ED_{50} , $\mu\text{g/ml}$)	
	Ludzki włókniakomięsak HT-1080	Mysi nowotwór okrężnicy L5-56
Pochodne chromanu Kwas 3-hydroksy-2,2-dimetylo-8-prenylochromano-6-propenowy	71,5	77,1
Pochodne chromenu Kwas 2,2-dimetylo-8-prenylochromeno-6-propenowy	46,9	50,2

Tab. 11. Aktywność cytotoksyczna diterpenów izolowanych z propolisu brazylijskiego wobec komórek nowotworowych (wg 5, 19)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (ED ₅₀ , µg/ml)				
	Komórki nowotworowe				
	HuH13 ¹	Hela ²	KB ³	HT-1080 ⁴	L5-26 ⁵
Pochodne klerodanu					
Kwas 13Z-symforetikulowy	18	23	22		
Kwas 13E-symforetikulowy	18	23	22		
Pochodne kwasu kupressowego					
Kwas izokupressowy				72,9	63,5
Kwas acetoksyizokupressowy				70,1	73,3
Kwas agatowy				75,4	95,9
Ester 15-metylowy kwasu agatowego				72,8	> 100
Kwas kupressowy				94,9	> 100

¹rak wątrobowokomórkowy (ludzki)²rak szyjki macicy (ludzki)³rak nosogardzieli (ludzki)⁴włókniakomięsak (ludzki)⁵rak okrężnicy (mysi)**Tab. 12.** Aktywność cytostatyczna triterpenów izolowanych z propolisu birmańskiego wobec komórek nowotworowych (wg 20)

Badane związki	Aktywność cytostatyczna (IC ₅₀ , µmol)					
	Komórki nowotworowe					
	ludzkie			mysie		
	HT-1080	A-549	Hela	L5-26	B16-BL6	LLC
Kwas izomangiferowy	75,2	61,2	73,0	69,6	29,6	94,3
Kwas 3α,27-dihydroksycykloart-24E-en-26-owy	28,2	37,1	12,8	27,8	5,9	40,1
Kwas 3α,22-dihydroksycykloart-24E-en-26-owy	95,2	98,4	99,7	92,3	49,9	96,4
Kwas 3-oksyo-23-hydroksy-cykloart-24E-en-26-owy	38,3	79,8	49,4	72,1	48,7	84,6
Kwas 3-oksycykloart-22Z,24E-dien-26-owy	35,9	79,6	63,7	45,8	47,4	59,9

wyzolowanych z propolisu birmańskiego, w tabeli 12 ujęto tylko 5 związków o najwyższej, ale słabej aktywności przeciwnowotworowej (IC₅₀ od 5,9 do 96,4 µmol).

Badania uzupełniające (21) wykazały, że kwas 3-oksyo-cykloart-22Z,24E-dien-26-owy (ryc. 6) działał silnie przeciwnowotworowo wobec komórek ludzkiego nowotworu trzustki PANC-1 (IC₅₀ wynosiła 4,3 µmol).

Benzopirany i dihydrobenzofurany

Hirota i wsp. (25) z ekstraktu metanolego otrzymanego z propolisu brazylijskiego

wyzolowali kwas (2)-2,2-dimetylo-8-(3-metylobutenylo)-benzopirano-6-propenowy oraz jego izomer optyczny (ryc. 7).

Oba wymienione związki działały cytotoksycznie wobec komórek ludzkiego raka płuc HLC-2. Pochodna benzopiranu o konfiguracji E hamowała rozwój komórek HLC-2 w stężeniu (IC₅₀) 10 µmol, a pochodna o konfiguracji Z w stężeniu 100 µmol.

Banskota i wsp. (5) z ekstraktu metanolego z propolisu brazylijskiego wyodrębnili pochodne dihydrobenzofuranu, a badania wykazały, że tremeton (ryc. 8), wiscidon i dimeryczny octan koniferylu miały niską aktywność przeciwnowotworową. Działały

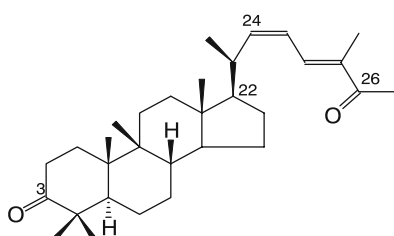
one na komórki ludzkiego włókniakomięsa HT-1080 i na komórki mysiego raka okrężnicy L5-26 w stężeniach (IC_{50}) od 38,9 do 58,1 $\mu\text{g/ml}$.

Izoflawany

Niezależnie od siebie Diaz-Carballo i wsp. (22) oraz Awale i wsp. (23) potwierdzili aktywność cytotoksyczną mukronulatu – pochodnej izoflawanu (ryc. 9). Diaz-Carballo i wsp. (22) wykazali, że związek ten działa na komórki ludzkiego nowotworu okrężnicy HCT8 w stężeniu (IC_{50}) 2,7 $\mu\text{g/ml}$. Z kolei Awale i wsp. (23) stwierdzili jego aktywność cytostatyczną (tab. 13) wobec komórek ludzkiego

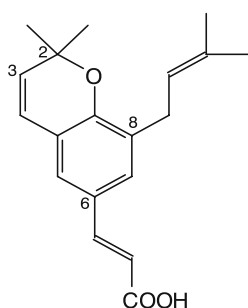
raka trzustki PANC-1 w stężeniu (IC_{50}) 50 μmol . Pozostałe 3 pochodne izoflawanowe: 7-O-metylo-wezytol, wezytol oraz izowezytol działały na komórki PANC-1 w stężeniach (IC_{50}) odpowiednio: 50, > 100 i > 100 μmol .

Diaz-Carballo i wsp. (24) przebadali działanie mukronulatu wobec komórek nowotworów z kolekcji szpitalnej, takich jak jelita krętego i jelita ślepego HCT8 WT, rak gruczołowy sutka MCF-7 WT, nerwiak niedojrzały LAN-1 WT i rak zarodkowy nerki HEK293 WT (tab. 14). Związek ten działał na komórki wymienionych nowotworów w stężeniach (IC_{50}) od 2,5 do 10,1 $\mu\text{g/ml}$.



Kwas 3-oksycykloart-22Z,24E-dien-26-owy

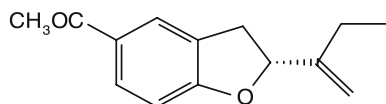
Ryc. 6. Budowa chemiczna pochodnej cykloartanu występującej w propolisie birmańskim (wg 20)



Kwas

(2)-2,2-dimetylo-8-(3-metylo-2-butenylo)-benzopirano-6-propenowy

Ryc. 7. Budowa chemiczna pochodnej benzopirany wyizolowanej z ekstraktu metanolowego otrzymanego z propolisu brazylijskiego (wg 21)

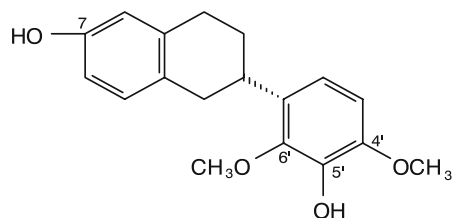


Tremeton

Ryc. 8. Wzór chemiczny pochodnej dihydrobenzofuranu wyizolowanej z ekstraktu metanolowego z propolisu brazylijskiego (wg 5)

Tab. 13. Aktywność cytotoksyczna dihydrobenzofuranów izolowanych z propolisu brazylijskiego wobec komórek nowotworowych (wg 5)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (IC_{50} , μmol)	
	Komórki nowotworowe	
	ludzkie HT-1080	mysie L5-26
Tremeton	57,4	58,1
Wiscidon	45,5	57,2
Dimeryczny octan koniferylu	38,9	39,9



Mukronulatol (7,5'-dihydroksy-4' 6'-dimetyloksyzaflawan)

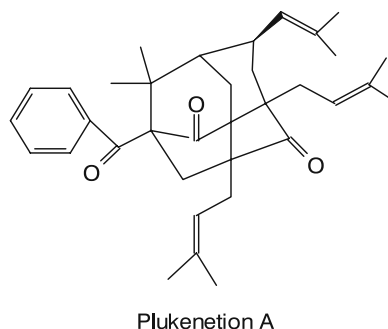
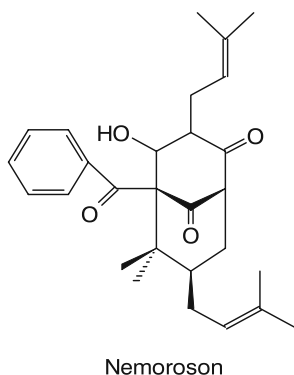
Ryc. 9. Wzór chemiczny pochodnej izoflawanu wyizolowanej z ekstraktów metanolowych otrzymanych z propolisu kubańskiego i brazylijskiego (wg 22 i 23)

Tab. 14. Aktywność cytotoksyczna mukronulatu w odniesieniu do komórek nowotworów z kolekcji szpitalnej (wg 24)

Komórki nowotworowe	Aktywność cytotoksyczna (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$)
Rak jelita krętego i jelita ślepego HCT8 WT	2,6
Rak gruczołowy sutka MCF-7 WT	2,5
Nerwiak niedojrzały LAN-1 WT	10,1
Rak zarodkowy nerki HEK293 WT	2,5

Benzofenony prenylowane

Diaz-Carballo i wsp. (24) badali aktywność cytostaticzną dwóch benzofenonów prenylowanych (nemoroson i plukenetion A), wyizolowanych z ekstraktu etanolowego z propolisu kubańskiego (ryc. 10). Wyniki badań (tab. 15) wskazują, że aktywność cytostaticzna nemorosonu była ponad 2-krotnie wyższa od plukenetionu A. Stężenia nemorosonu (IC_{50}) hamujące rozwój badanych komórek nowotworowych wynosiły od 2,0 do 21,7 $\mu\text{g/ml}$; średnio 6,2 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast stężenia plukenetionu A (IC_{50}) hamujące rozwój badanych komórek nowotworowych wynosiły od 5,3 do 32,1; średnio 14,5 $\mu\text{g/ml}$.



Ryc. 10. Budowa chemiczna benzofenonów prenylowanych wyizolowanych z propolisu kubańskiego (wg 24)

Pterokarpany

Awale i wsp. (23) z ekstraktu metanolowego z propolisu brazylijskiego wyodrębnili 7 pochodnych karpantu i pterokarpanu (tab. 16). Związki te wykazywały niską i średnią aktywność cytostaticzną wobec komórek nowotworowych ludzkiego raka trzustki PANC-1. Najsilniej wzrost komórek tego nowotworu (IC_{50} 12,5 μmol) hamował (6aR,11aR)-3,8-dihydroksy-9-metoksypterokarpan (ryc. 11).

Na podstawie przytoczonych przykładów można wnioskować, że pojedyncze związki wyodrębnione z propolisu mogą wykazywać słabsze działanie na poszczególne linie komórek nowotworowych w porównaniu

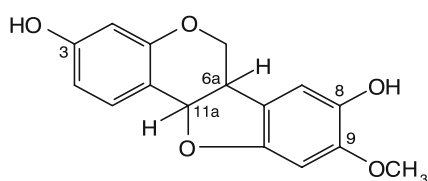
Tab. 15. Aktywność cytostaticzna nemorosonu i plukenetionu A wobec komórek nowotworów z kolekcji szpitalnej (wg 24)

Komórki nowotworowe	Aktywność cytostaticzna (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$)	
	nemoroson	plukenetion A
Gruzołakorak okrężnicy HT29 WT	5,3	12,0
Rak jelita krętego i jelita ślepego HCT8 WT	4,2	12,9
Rak gruczołowy sutka MCF-7 WT	4,4	16,3
Gruzołakorak jajnika A2780 CP	6,2	15,9
Rak żołądka MS1 WT	5,7	5,6
Nerwiak niedojrzały LAN-1 WT	8,2	N
Gruzołakorak prostaty PC-3 WT	2,0	N
Ostra białaczka limfatyczna Jurkat WT	4,6	5,3
Przewlekła białaczka szpikowa K-562 WT	4,2	N
Rak płuc wielkokomórkowy H460 WT	4,2	13,4
Rak zarodkowy nerki HEK293 WT	4,2	32,1
Pierwotny rak fibroblastyczny płuc MCR-5	21,7	15,7
Średnia aktywność cytostaticzna	6,2	14,5

N – nie badano

Tab. 16. Aktywność cytotoksyczna pochodnych karpanu i pterokarpanu wobec komórek ludzkiego raka trzustki PANC-1 (wg 23)

Badane związki	Aktywność cytotoksyczna (IC_{50} , μmol) komórki ludzkiego raka trzustki PANC-1
(6aS,11aS)-6a-etoksymedikarpan	> 100
(6aS,11aS)-medikarpan	50
(6aR,11aR)-3,4-dihydroksy-9-metoksypterokarpan	25
(6aR,11aR)-4-metoksymedikarpan	> 100
(6aR,11aR)-3-hydroksy-8,9-dimetoksypterokarpan	> 100
(6aS,11aS)-3,10-dihydroksy-9-metoksypterokarpan	50
(6aR,11aR)-3,8-dihydroksy-9-metoksypterokarpan	12,5



(6aR,11aR)-3,8-dichydroksy-9-metoksypterokarpan

Ryc. 11. Budowa chemiczna pochodnej pterokarpanu wyizolowanej z ekstraktu z propolisu brazylijskiego (wg 23)

z jego wodnym ekstraktem. Wykazano znacząco wyższy stopień obniżenia przerzutów komórek nowotworowych do narządów badanych zwierząt dla wodnego ekstraktu z propolisu (WSDP) w porównaniu z samym izolowanym związkiem, czego przykładem może być kwas kawowy (5). Dowodzi to silniejszej aktywności ekstraktu z propolisu, będącego kompleksem wielu składników, nad pojedynczym wyodrębnionym związkiem. Badania wykazały, że w obecności kwasu kawowego zachodziły w komórkach zjawiska apoptozy lub nekrozy. Autorzy sugerują również, że aktywności immunomodulującej tego związku może towarzyszyć aktywacja makrofagów i wzrost ich zdolności litycznej w stosunku do komórek nowotworowych. Mogą one przebiegać w bezpośrednim kontakcie z komórką

nowotworową lub też na drodze wytwarzania czynników powodujących ich lizę. Zatem antymetastatyczna aktywność kwasu kawowego i WSDP wiąże się głównie z ich właściwościami immunomodulującymi, aktywnością cytotoksyczną oraz zdolnością do indukowania apoptozy lub nekrozy komórek. Podsumowując przeciwnowotworowe działanie propolisu, jest wynikiem synergistycznego działania jego składników biologicznie aktywnych.

Podsumowanie

Omówione powyżej badania wskazują, że związki wyizolowane z propolisu należące do różnych grup chemicznych charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością cytostatyczną wobec zastosowanych linii komórek nowotworowych ludzkich i zwierzęcych ($IC_{50} = 2,0 - > 100,0 \mu\text{g/ml}$). Niektóre substancje występujące zarówno w propolisie europejskim, jak również w propolisie z rejonów tropikalnych wykazywały silne działanie cytostatyczne ($IC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$). Zalicza się do nich prenylowane flawonoidy (propolin A), prenylowane kwasy aromatyczne (artepillina C), estry kwasów aromatycznych (np. CAPE), izoflawany (mukronulatol) oraz prenylowane benzofenony (nemoroson i plukenetion A). Związki te mogłyby być potencjalnie wykorzystane w leczeniu chorób nowotworowych.

Piśmiennictwo

- Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. I. Ester fenyletylowy kwasu kawowego CAPE. *Post Fitoter* 2020; 21(3):177-84.
- Hołderna-Kędzia E, Kędzia B. Przeciwnowotworowe działanie składników propolisu. Cz. II. Związki flawonoidowe. *Post Fitoter* 2020; 21(4):2-9.
- Nikolov N, Marekov N, Bankova V i wsp. Method for the preparation of water-soluble derivate of propolis. *Bulg J Path Appl* 1987, 79903/28,05.
- Greenway W, May J, Scaysbrook T i wsp. Identification by gas chromatography – mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z Naturforsch* 1991; 46c:111-21.
- Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK i wsp. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod* 1998; 61:896-900.
- 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.

7. Usia T, Banskota AH, Tezuka Y i wsp. Constituents of Chinese Propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* 2002; 65:673-6.
8. Szliszka E, Czuba ZP, Domino M i wsp. Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 2009; 14:738-54.
9. Oršolič N, Knežević AH, Šver L i wsp. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 2004; 94:307-15.
10. Oršolič N, Trezič S, Mihajlevič Ž i wsp. Effects of local administration of propolis and its cytotoxic and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1928-33.
11. Oršolič N, Šaranović AB, Bašić I. Direct and indirect mechanism (s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med* 2006; 72:20-7.
12. Matsuno T, Jung S-K, Matsumoto Y i wsp. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res* 1997; 17:3565-8.
13. Kimoto T, Koya S, Hino K i wsp. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Pathol Int* 2000; 50:679-89.
14. 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 artepillin C. *Virchows Arch* 2001; 438:259-70.
15. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K i wsp. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44:230-2.
16. Rao CV, Desai D, Kaul B i wsp. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact* 1992; 84:277-90.
17. Rao CV, Desai D, Simi B i wsp. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 1993; 53:4182-8.
18. Rao CV, Desai D, Rivenson A i wsp. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res* 1995; 55:2310-5.
19. Matsuno T, Matsumoto Y, Saito M i wsp. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Z Naturforsch* 1997; 52C:702-4.
20. Li F, Awale S, Tezuka Y i wsp. Cytotoxic constituents of propolis from Myanmar and their structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* 2009; 32:2075-8.
21. Li F, Awale S, Zhang H 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.
22. Diaz-Carballo D, Hler MA, Malak S i wsp. Mucronulatol from Caribbean propolis exerts cytotoxic effects on human tumor cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008; 46:226-35.
23. Awale S, Li F, Onozuka H i wsp. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:181-9.
24. Diaz-Carballo D, Malak S, Bardenhever W i wsp. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:9635-43.
25. Hirota M, Matsuno T, Fujiwara T i wsp. Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer benzopyran derivative of propolis. *J Nat Prod* 2000; 63:366-70.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 12.01.2021

zaakceptowano/accepted: 02.02.2021

Adres/address:

*mgr farm. Elżbieta Hołderna-Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań
tel.: +48 (61) 845-58-67
e-mail: elzbieta.kedzia@iwnirz.pl