Wydział Farmaceutyczny

z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Urszula Czyżewska

Ocena składu chemicznego, właściwości cytotoksycznych etanolowych ekstraktów z propolisu w hodowli komórek raka płaskonabłonkowego

Rozprawa doktorska

w dziedzinie nauk farmaceutycznych

Białystok 2016 r.

# Streszczenie

Rak języka to najczęściej występujący nowotwór jamy ustnej, zaklasyfikowany do grupy nowotworów głowy i szyi. Liczba zachorowań na ten typ nowotworu niezmiernie wzrasta, a odsetkowy udział wśród wszystkich nowotworów złośliwych szacuje się na poziomie od 4 do 6.2% w Polsce, innych krajach europejskich oraz Stanach Zjednoczonych. Nowotwory narządów głowy   
i szyi cechuje ogólnie niekorzystne rokowanie. Obecnie, do standardowych metod leczenia chorych zaliczana jest chirurgia i radioterapia [44].

Propolis to naturalny produkt pszczeli o bogatym składzie chemicznym, wykazujący szerokie spektrum działań biologicznych [1-4]. Ze względu na wysoką zawartość polifenoli, etanolowe ekstrakty z propolisu wykazują działanie cytotoksyczne oraz zdolność indukowania apoptozy w wielu liniach komórek nowotworowych [21-23, 45]. Do tej pory nie podjęto próby scharakteryzowania potencjalnych mechanizmów działania przeciwnowotworowego składników propolisu w komórkach płaskonabłonkowego ludzkiego raka języka CAL-27.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej było zbadanie wpływu etanolowych ekstraktów z propolisu, pojedynczych polifenoli oraz mieszaniny polifenoli na przeżywalność, oraz procesy apoptotyczne komórek raka płaskonabłonkowego języka. Zadaniem niniejszej pracy była także ocena składu chemicznego etanolowych preparatów farmaceutycznych z propolisu z wykorzystaniem techniki GC-MS. Dokonano również analizy ilościowej wybranych związków polifenolowych w badanych ekstraktach.

Na podstawie wyników badań otrzymanych techniką GC-MS stwierdzono, że preparaty farmaceutyczne wytworzone z propolisu zawierają w składzie około 230 związków chemicznych. Do składników występujących w największych zawartościach względnych w badanych preparatach propolisu zaliczono związki polifenolowe: chryzynę, galanginę, pinocembrynę, pinobanksynę, kwas *p*-kumarowy, ferulowy oraz kawowy, dla których przeprowadzono analizę ilościową metodą GC-MS. Sumaryczną zawartość oznaczonych polifenoli oznaczono na poziomie 8.76 (próbka EEP-1), 3.79 (próbka EEP-2) oraz 6.65 (próbka EEP-3) mg/ml ekstraktu. Ustalono, że badane próbki reprezentują typ topolowy propolisu, charakterystyczny dla strefy umiarkowanej.

Stwierdzono, że etanolowe ekstrakty z propolisu, pojedyncze polifenole oraz mieszanina polifenoli wykazują aktywność cytotoksyczną, z tym że mieszanina związków polifenolowych znacznie obniżała przeżywalność komórek CAL-27. Aktywność proapoptotyczna ekstraktów może być wynikiem synergistycznego działania najbardziej intensywnych polifenoli w propolisie. Dodatkowe badania mechanizmu apoptozy wskazują, że ekstrakty z propolisu, mieszanina polifenoli oraz chryzyna wyraźnie indukują apoptozę nad drodze wewnętrznej i zewnętrznej. Pozostałe polifenole mogą wzbudzać apoptozę na drodze wewnętrznej.

Wyniki niniejszych badań wskazują na cytotoksyczne oraz proapoptotyczne właściwości propolisu, które związane są z synergizmem działania jego składników na komórki nowotworowe ludzkiego raka języka CAL-27.

Przedstawione w pracy wyniki są podstawą do prowadzenia dalszych prac badawczych nad zastosowaniem propolisu w terapii przeciwnowotworowej   
w raka płaskonabłonkowego języka.

# Streszczenie w języku angielskim

Tongue cancer is the most common oral cancer, classified as a part of the group of head and neck cancers. The incidence of this type of cancer has significantly increased around the world. This disease occurs in approximately 4 to 6.2% of all malignancies reported in Poland, other European countries and the United States. Head and neck cancer have been characterized by an unfavorable prognosis. Current therapies include standard surgery and radiation therapy [44].

Propolis is a natural bee product with complex chemical composition, demonstrating a wide spectrum of biological activity [1-4]. Due to the high content of polyphenols, ethanolic extract of propolis exhibits cytotoxic activity, and is capable of inducing apoptosis in many tumor cell lines [21-23, 45]. This work has been undertaken to study the molecular mechanism by which propolis exerts its cytotoxic effect on human tongue squamous cell carcinoma (CAL-27).

The primary goal of the doctoral thesis was to investigate the effect of ethanol extracts of propolis (EEP), individual polyphenols and mixtures of polyphenols on the viability and apoptotic effect of the CAL-27 cell line. The purpose of this study was to evaluate the chemical composition of pharmaceutical preparations of propolis extracts using GC-MS. Quantitative analysis of selected polyphenolic compounds was conducted.

Based on the GC-MS results, about 230 compounds were found in the pharmaceutical formulations of propolis. The most abundant components were polyphenols including chrysin, galangin, pinocembrin, pinobanksin, p-coumaric acid, ferulic acid and caffeic acid. The total content of polyphenols was determined at 8.76 mg/ml (sample EEP-1), 3.79 mg/ml (sample EEP-2) and 6.65 mg/ml (sample EEP-3) level. It was found that all samples represent a type of poplar propolis.

The results of this work indicated the cytotoxic effects of EEP, flavonoids, phenolic acid and a minute of polyphenols on CAL-27 cell line. All of these agents were able to induce apoptosis of CAL-27 cell line. The findings showed that EEP and a mixture of polyphenols were most effective. Therefore, we suggest that the propapoptotic activity of EEP could be linked with the synergistic effect of the most abundant polyphenols in propolis. Additional studies of the mechanism of apoptosis indicate that EEP, a mixture of polyphenols and chrysin might induce apoptosis by mitochondrial and death receptor pathways. Other polyphenols could induce apoptosis by the mitochondrial pathways.

The results of this study demonstrate the proapoptotic and cytotoxic effects of propolis on human tongue squamous cancer cell. The outcomes can be considered as the basis for further research related to the effectiveness of propolis in anticancer oral therapy.