

## Ocena właściwości proapoptotycznych etanolowego ekstraktu propolisu w badaniach *in vitro*\*\*

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Patologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
Kierownik Katedry i Zakładu Patologii: prof. dr hab. n. med. Barbara Stawiarska-Pięta

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Fizjologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. Krystyna Wanda Żwirska-Korczała

### THE IN VITRO PROAPOPTOTIC ACTIVITIES EVALUATION OF ETHANOLIC EXTRACT OF PROPOLIS

#### SUMMARY

Modern epidemiological data prove that the majority of substances of natural origin demonstrating anticancerogenic properties are non-toxic, safe and in a longer term do not influence a human organism in a negative way. The research involved an *in vitro* model with the use of propolis that belongs to these substances in order to show its anti-neoplastic properties. A solution of ethanol extract of propolis (EEP) in dimethyl sulfoxide was used as a material for the research. In the conducted research, an increase in the percentage of apoptotic cells in both the case of Me45 malignant melanoma and Hct-116 colorectal cancer cell lines was observed. Used EEP with concentration of 50 µg/ml caused a 16.56% increase in the number of apoptotic cells in the case of Me45 and a 21.02% increase in the case of Hct-116. A 0.498 ng/mg increase in the concentration of caspase-8 in the Me45 malignant melanoma cell culture, to which EEP with concentration 50 µg/ml was added, was showed in relation to its concentration in the control culture. In the case of Hct-116 line, an increase of caspase concentration amounted to 0.884 ng/mg in cultures with addition of the same dose of propolis, in relation to the value in the group without propolis. The increase in apoptosis of neoplastic cell lines *in vitro* was higher after administration of EEP with concentration of 100 µg/ml vs. 50 µg/ml.

KEY WORDS: APOPTOSIS – ETHANOLIC EXTRACT OF PROPOLIS – COLORECTAL CANCER AND MALIGNANT MELANOMA CELL LINES

### Wstęp

Apoptoza jest ważnym celem terapii przeciwnowotworowej, jednakże większość środków farmakologicznych stosowanych w chemioterapii indukuje apoptozę zarówno w komórkach objętych procesem nowotworowym, jak i prawidłowych, co nie jest bez znaczenia w uzyskaniu właściwego celu terapeutycz-

nego. Modulowanie skłonności komórki do ulegania apoptozie wzbudza więc z oczywistych względów zainteresowanie onkologów. Ograniczenia wynikające ze stosowania leków przeciwnowotworowych, które uszkadzają prawidłowe komórki, przyczyniają się do poszukiwania związków, które wybiórczo wykazywałyby działanie toksyczne tylko wobec komórek nowotworowych (1).

Nowym trendem w ogólnościowych badaniach, związanych z apiterapią, jest szersze poznanie mechanizmów aktywności proapoptotycznej propolisu w stosunku do komórek zmienionych nowotworowo. Wielu naukowców sugeruje, że substancje biologicznie czynne zawarte w propolisie zdolne są do aktywowania szlaku programowanej śmierci komórek, który w procesie onkogenezy zostaje zahamowany.

Działanie takie potwierdzono już w badaniach *in vitro* na komórkach nowotworowych. Aktywność taka, jak sugerują autorzy jest spowodowana synergizmem substancji chemicznych zawartych w propolisie (2).

Propolis to produkt bezpostaciowy, lepki i kleisty. Jego barwa jest zależna od surowca z jakiego się go pozyskuje. Może mieć kolor żółty, szarzielony, zielony, czerwony, brunatny, nawet czarny. Propolis ma charakterystyczny zapach, w którym wyczuwa się aromat igliwia i miodu. W Polsce, podobnie jak w krajach Europy Środkowej i Wschodniej, propolis pozyskiwany jest głównie z topoli czarnej (*Populus nigra*), poza tym z brzozy (*Betula*) i olchy (*Alnus*) (3-5).

Propolis zawiera w swym składzie od 50 do 80% substancji żywicznych, 8-30% wosku pszczelego, a ponadto olejki eteryczne (1-4%), wosk roślinny (6%), garbniki (10%), pyłek kwiatowy (5%) oraz substancje lipidowo-woskowe (8%). Do celów leczniczych, die-

\*\*Badania finansowane z umowy statutowej nr KNW-1-014/09.

tetycznych oraz w kosmetyce bardzo rzadko wykorzystuje się surowy propolis; standardowo stosowany jest jego etanolowy ekstrakt EEP (z ang. *ethanolic extract of propolis*). Sposób ekstrakcji został dokładnie opracowany w kilku ośrodkach krajowych (6, 7).

Do najistotniejszych związków chemicznych zawartych w EEP pozyskanym z krajowego propolisu należą flawonoidy (tylko aglikony, nie występują formy glikozydowe) oraz kwasy aromatyczne (8).

Propolis pozyskiwany przez pszczoły w różnych zakątkach świata wykazuje dużą różnorodność pod względem składu chemicznego. Jest to spowodowane strefą geograficzną, rasą pszczół, gatunkami i pochodzeniem roślin oraz zmianami klimatycznymi. Co istotne, pomimo odmienności składników, propolis zawsze odznacza się wysoką aktywnością biologiczną oraz wykazuje podobne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, antyoksydacyjne, przeciwgrzybiczne, przeciwproliferacyjne, przeciwzapalne, immunomodulacyjne (9). Niektóre odmiany charakteryzują się zwiększoną aktywnością przeciwproliferacyjną, proapoptotyczną czy przeciwzapalną (4, 10, 11).

Ze względu na bogaty skład chemiczny, propolis wykazuje największą spośród wszystkich produktów pszczelich aktywność i skuteczność leczniczą (12). Aktywność taka jest spowodowana synergizmem substancji chemicznych zawartych w propolisie. Wpływ cytotoksyczny w badaniach z użyciem zielonego propolisu wykazali brazylijscy naukowcy w hodowlach linii komórkowej raka krtani HEP-2. Stwierdzono, że wysokie stężenia propolisu dodawane do hodowli komórkowych powodowały krótkotrwały efekt cytotoksyczny, w przeciwieństwie do niskich stężeń, gdzie aktywność ta wzrastała z czasem (2).

Przeciwproliferacyjne i proapoptotyczne działanie propolisu oraz jego składników polega m.in. na aktywacji kaspazy oraz inaktywacji genu AKT, kodującego enzymy biorące udział w procesach blokujących proces apoptozy (13).

### Cel pracy

Celem prezentowanej pracy była ocena właściwości proapoptotycznych propolisu w zależności od użytych jego stężeń w stosunku do komórek raka okrężnicy oraz czerniaka złośliwego w hodowlach *in vitro*.

### Materiał i metody

#### Otrzymywanie etanolowego ekstraktu z propolisu

Materiałem stosowanym do badań był etanolowy ekstrakt z propolisu. Surowy propolis (kit pszczeli) pochodził z pasieki w miejscowości Rożnowice (woj. małopolskie) w Polsce.

W celu przeprowadzenia ekstrakcji surowy propolis rozdrobniono mechanicznie. W kolbie płaskodennej umieszczono 10 g surowego propolisu oraz 100 g etanolu o stężeniu 96%. Następnie wykonano ekstrakcję surowego propolisu, polegającą na umieszczeniu zamkniętej kolby w łaźni wodnej z wytrząsarką o temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Proces ten prowadzono przez okres dwóch tygodni. Po umieszczeniu uzyskanego ekstraktu na 24 godz. w lodówce o temp. 4°C, przesączono go przez bibułę i następnie etanol odparowano w wyparce próżniowej w temp. 40°C. Otrzymaną w ten sposób ciągliwą, brunatną substancję o charakterystycznym zapachu, pozostawiono w cieplarni o temp. 37°C na okres 7 dni, w celu odparowania pozostałości etanolu. W ten sposób uzyskano suchy ekstrakt propolisu, który rozpuszczono w DMSO (dimetylosulfotlenku), tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło 100 mg/ml (6).

### Hodowla komórek

Doświadczenie wykonano przy użyciu następujących linii komórkowych: ludzkiego czerniaka złośliwego Me45 pochodzącego z kolekcji Centrum Onkologii w Gliwicach oraz ludzkiego raka okrężnicy Hct-116, pochodzącego z kolekcji ATCC: CCL-247.

Komórki hodowane były na podłożu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS) oraz z dodatkiem odpowiedniej ilości antybiotyków i fungistatyków. Hodowla linii komórkowych odbywała się w temp. 37°C, w środowisku o wilgotności 95% przy stężeniu CO<sub>2</sub> 5%, co warunkuje utrzymanie prawidłowego pH pożywki hodowlanej. Pasażowanie wykonywano przy użyciu trypsyny w stężeniu 0,25% w PBS (*phosphate buffered saline*).

Na komórkach w logarytmicznej fazie wzrostu zostały wykonane dalsze doświadczenia z użyciem EEP, gdzie jako rozpuszczalnika użyto DMSO. Hodowle komórek nowotworowych prowadzono w podłożu hodowlanym, do którego dodawano EEP w warunkach sterylnych, do uzyskania końcowego stężenia propolisu: 50 lub 100 µg/ml. Równolegle wykonano hodowlę kontrolną z zastosowaniem DMSO na badane parametry. Nie wykazano istotnego statystycznie wpływu dimetylosulfotlenku na poziom kaspazy-8 oraz zmianę morfologii jąder komórkowych oraz cytoplazmy.

#### Ocena cytomorfologiczna komórek nowotworowych

Oznaczenia komórek apoptotycznych, nekrotycznych oraz komórek zdrowych dokonano metodą mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu Apoptotic, Necrotic and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium), zgodnie z protokołem producenta. Apoptozę

oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym (Zeiss) przy użyciu odpowiedniego fluorochromu. Dla próbek inkubowanych z EEP o stężeniu 50 i 100  $\mu\text{g/ml}$  oraz bez użycia EEP, wyznaczono wskaźnik apoptotyczny oraz nekrotyczny komórek, odpowiadający procentowi komórek o morfologii typowej dla komórek odpowiednio apoptotycznych oraz nekrotycznych, w stosunku do 100 ocenianych komórek w analizowanych polach widzenia (14).

#### Oznaczenie stężenia kaspazy-8

Do oceny stężenia kaspazy-8 wykorzystano test firmy BioVendor Research and Diagnostic Products. Wyznaczenie stężenia kaspazy-8 dokonano także zgodnie z protokołem producenta. W tym celu do hodowli komórkowych dodano EEP, którego końcowe stężenie w podłożu hodowlanym wynosiło 50 oraz 100  $\mu\text{g/ml}$ . Komórki inkubowano z EEP przez 48 h, po tym czasie dokonano lizy komórek, stosując załączony do zestawu odczynnik i postępowano zgodnie z dalszymi częściami protokołu dołączonego do zestawu.

#### Oznaczenie białka całkowitego metodą Bradforda

Stężenia kaspazy-8 przedstawiono w przeliczeniu na miligram białka całkowitego. W tym celu dokonano oznaczenia białka całkowitego metodą Bradforda, wykorzystującą zdolność wiązania barwnika Coomassie G-250 z grupami aminowymi białek. Krzywą kalibracyjną wyznaczono dla wzorcowego białka albuminy wołowej – BSA (*Bovine serum albumin*). Zawartość białka w badanej próbce (lizat pochodzący z hodowlanych komórek) określano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=595$  nm.

#### Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Do utworzenia bazy danych posłużył program Microsoft Excel 2003 for Macbook. Analizę statystyczną

uzyskanych wyników wykonano za pomocą programu Sofa Statistics (Paton-Simpson & Associates Ltd.). Normalność wyników sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. W tabelach przedstawiono wartości średnie, odchylenie standardowe uzyskane w czterech oddzielnych hodowlach, przeprowadzanych w czterech powtórzeniach ( $n=16$ ). Do oceny wyników z rozkładem normalnym użyto testu t-Studenta dla prób niezależnych, w przypadku wyników nie mających rozkładu normalnego zastosowano test nieparametryczny U'-Manna-Whitneya.

## Wyniki

#### Morfologia komórek

W obrazie mikroskopu fluorescencyjnego stwierdzono różnice w budowie komórek. Dotyczyły one jąder komórek. W hodowlach kontrolnych charakteryzowały się one homogennością i idealnym okrągłym bądź owalnym kształtem, natomiast w komórkach apoptotycznych (w hodowlach z EEP) widoczne były charakterystyczne zmiany w obrębie jądra, takie jak ich obkurczenie, kondensacja chromatyny lub fragmentacja jądra.

Komórki oceniano wizualnie i zliczano je z jednoczesnym rozróżnieniem na komórki żywe, apoptotyczne oraz komórki nekrotyczne. Następnie wyliczono procentową zawartość tych komórek w danej grupie. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

W badaniach wykazano wzrost odsetka komórek apoptotycznych zarówno w przypadku linii czerniaka złośliwego Me45, jak i raka okrężnicy Hct-116. Zmiany te były znamienne statystycznie. W obecności EEP o stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$  zaobserwowano wzrost liczby komórek apoptotycznych o 16,56% w przypadku linii Me45 oraz o 21,02% w przypadku komórek linii raka okrężnicy Hct-116.

**Tabela 1.** Morfologia komórek ludzkiego raka okrężnicy HCT-116 i ludzkiego czerniaka złośliwego Me45 w hodowlach poddanych działaniu EEP.

Substancje	Odsetek komórek w hodowlach czerniaka złośliwego i raka jelita grubego					
	Komórki żywe		Komórki nekrotyczne		Komórki apoptotyczne	
	Me45	HCT-116	Me45	HCT-116	Me45	HCT-116
Kontrola (K)	97,11 $\pm$ 2,38%	98,25 $\pm$ 2,98%	2,11 $\pm$ 0,23%	1,09 $\pm$ 0,12%	0,78 $\pm$ 0,18%	0,66 $\pm$ 0,12%
EEP (50 $\mu\text{g/ml}$ )	74,23 $\pm$ 1,78%*	72,06 $\pm$ 2,21%*	8,43 $\pm$ 1,02%*	6,26 $\pm$ 0,92%*	17,34 $\pm$ 0,96%*	21,68 $\pm$ 3,19%*
EEP (100 $\mu\text{g/ml}$ )	58,22 $\pm$ 2,85%*	64,01 $\pm$ 1,65%*	15,95 $\pm$ 0,96%*	6,23 $\pm$ 0,65%*	25,83 $\pm$ 1,11%*	29,76 $\pm$ 2,92%*

\* $p<0,05$

Po 48 h inkubacji komórek Me45 z EEP o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  wzrost odsetka komórek apoptotycznych był znacznie wyższy (o 25,05%) w przypadku komórek Me45 oraz o 29,1% w stosunku do komórek hodowli kontrolnej.

### Wyniki oznaczenia kaspazy-8

W tabeli 2 przedstawiono wyniki oznaczenia stężenia białka kaspazy-8.

W badaniach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia kaspazy-8 w wyniku zastosowania EEP. W przypadku linii czerniaka złośliwego Me45 zaobserwowano wzrost stężenia kaspazy-8 o 0,498 ng/mg po zastosowaniu EEP o stężeniu 50  $\mu\text{g/ml}$  oraz o 0,738 ng/mg w przypadku hodowli z dodatkiem EEP o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$ . W przypadku linii Hct-116 wartości te wynosiły odpowiednio: 0,884 ng/mg – dla stężenia EEP 50  $\mu\text{g/ml}$  oraz 2,412 ng/mg – dla stężenia EEP 100  $\mu\text{g/ml}$ . Wszystkie obserwowane zmiany były istotne statystycznie w stosunku do wartości oznaczanych w grupie kontrolnej.

### Dyskusja

Propolis należy do substancji pochodzenia naturalnego o wielokierunkowym działaniu korzystnym na organizm zwierząt i ludzi. Ze względu na różnorodność składu i różne działanie związków, które występują w propolisie, może on być w przyszłości wykorzystany do wspomagania leczenia chemoterapeutycznego lub zmniejszenia jego negatywnych skutków.

W przeprowadzonym eksperymencie komórki nowotworowe narażone na działanie różnych stężeń etanolowego ekstraktu propolisu (EEP) wykazywały zmiany nekrotyczne i apoptotyczne. Wyższy wzrost apoptozy i nekrozy obserwowano przy wyższych stężeniach EEP.

Podobne zmiany stwierdzili Ang i wsp. (15). Apoptozę w komórkach OCL oceniali poprzez wpływ składnika propolisu CAPE (estru fenyloetylowego

kwasu kawowego) na aktywację czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i NFAT. Po podaniu CAPE w stężeniu 10  $\mu\text{mol}$ , zaobserwowali wzrost apoptozy. W badaniach przeprowadzonych na linii komórek RAW 264,7 przy stężeniu 0,1  $\mu\text{mol}$  CAPE liczba komórek wczesnoapoptotycznych była znikoma, jednak stężenia większe niż 1  $\mu\text{mol}$  powodowały gwałtowny wzrost ich odsetka, doprowadzając do 50% całej populacji przy stężeniu 5  $\mu\text{mol}$ .

Również naukowcy z Uniwersytetu w Taipei (16, 17) wykazali proapoptotyczny wpływ CAPE na komórki nowotworowe. Zbadali oni wpływ CAPE na indukcję programowalnej śmierci komórki w stosunku do ludzkich komórek nowotworowych trzustki PANC-1 i BxPC-3. Zastosowane stężenie 10  $\mu\text{mol}$  CAPE wystarczyło, aby odnotować znaczący spadek liczby komórek w obrazie mikroskopowym, jednakże elektroforeza DNA nie wykazała fragmentacji materiału genetycznego. Potwierdzenie dużej roli składników propolisu w indukowaniu apoptozy uzyskano w eksperymencie, na podstawie znacznego spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego.

Natomiast Vatasever i wsp. (18) w badaniach na komórkach raka sutka wykazali, że narażenie komórek MCF-7 na działanie propolisu spowodowało spadek ich liczby, co było efektem zwiększonej jego cytotoksyczności. Działanie to zależało od stężenia propolisu i czasu inkubacji. Podobnie Bufalo i wsp. (2) w badaniach na linii komórek Hep-2 zaobserwowali, że z wydłużeniem inkubacji niskie stężenia propolisu powodują podobny efekt cytotoksyczny, jak krótkotrwałe narażenie na względnie dużą dawkę propolisu (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

W badaniach wykazano także, że składniki propolisu – propoliny, hamują wzrost komórek nowotworowych. W stosunku do linii ludzkich komórek czerniaka A2058, propoliny zastosowane w różnych stężeniach (1,25-40  $\mu\text{g/ml}$ ) wykazały wysoką skuteczność, szczególnie propoliny D i E, w indukowaniu apoptozy, działaniu antyoksydacyjnym i cytotoksycznym (19).

Tabela 2. Stężenie białka kaspazy-8 w lizatach hodowli komórkowych.

Substancje	Stężenie białka kaspazy-8 w hodowlach komórek ludzkiego czerniaka złośliwego Me45 (ng/mg białka całkowitego)		Stężenie białka kaspazy-8 w hodowlach komórek raka jelita Hct-116 (ng/mg białka całkowitego)	
	Średnia $\pm$ SD	p	Średnia $\pm$ SD	p
Kontrola (K)	0,253 $\pm$ 0,021	–	0,282 $\pm$ 0,018	–
EEP (50 $\mu\text{g/ml}$ )	0,751 $\pm$ 0,027	<0,0001	1,166 $\pm$ 0,014	<0,0001
EEP (100 $\mu\text{g/ml}$ )	0,991 $\pm$ 0,043	<0,0001	2,694 $\pm$ 0,021	<0,0001



Szliszka i wsp. (20) wykazali znaczącą rolę etanolowego ekstraktu propolisu w chemoprewencji raka prostaty. Zbadali oni cytotoksyczne i apoptotyczne właściwości EEP i wyizolowanych z niego związków fenolowych, na dwóch liniach komórkowych raka prostaty: LNCaP i DU145. Po 48-godzinnej inkubacji zaobserwowali wzrost toksyczności komórek nowotworowych zarówno linii LNCaP, jak i linii DU145 przy stężeniach 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  EEP.

Podobne badania prowadzono na linii komórek raka szyjki macicy HeLa. Jak w poprzednich przypadkach indukcja apoptozy i hamowanie wzrostu komórek nowotworowych było zależne od stężenia zastosowanego EEP. Po 48-godzinnej inkubacji najwyższy odsetek komórek apoptotycznych zaobserwowano przy najwyższym stężeniu propolisu. Detekcja procesu programowalnej śmierci komórki za pomocą cytometrii przepływowej została uwidoczniła dzięki barwieniu aneksyną V. Na uwagę zasługuje fakt, że EEP silnie wspomaga proces apoptozy indukowany przez TRAIL (21).

Szliszka i wsp. (22) wykazali apoptotyczną i cytotoksyczną aktywność chalkonów w stosunku do komórek raka prostaty. Te prekursorzy biosyntezy flawonoidów zawarte w propolisie przyczyniają się do jego antykancerogenego działania, blokując zwykle cykl komórkowy w fazie G2/M. Cytotoksyczność chalkonów rosła wraz z ich stężeniem. Podobną zależność wykazano w odniesieniu do apoptozy.

Bronikowska i wsp. (23) stwierdzili, że izoflawony – inna grupa związków zawartych w propolisie, również wykazują podobne działanie proapoptotyczne. Neobavaisoflawon wywoływał najsilniejszą apoptozę w kombinacji z TRAIL na komórki HeLa. W badaniach tych wykazano także, że genisteina oraz biochanina-A w połączeniu z TRAIL indukują apoptozę w komórkach nowotworowych odpowiednio na poziomie 54,88 % (genisteina) oraz 34,63 % (biochanina-A).

Nasilenie apoptozy można wykazać na podstawie zmian w parametrach biochemicznych, np. w aktywności enzymów lub stężeniu białek enzymatycznych. Jednym z nich jest kaspaza-8, która odgrywa istotną rolę w tym procesie. W apoptozie uczestniczą między innymi białka nadrodziny receptorów czynnika nekrozy TNF bogate w cysteinę, zewnątrz błonowe domeny zwane domenami śmierci (14). Po związaniu odpowiedniego liganda receptory błonowe ulegają trimeryzacji. W ten sposób sygnał śmierci jest przekazywany do białka adaptorowego FADD (*Fas Associated protein with Death Domain*), które dzięki obecności domeny DD (*death domain*) łączy się z domeną DD receptora. Na końcu łańcucha polipeptydowego białka FADD lub TRADD znaj-

duje się domena DED (*death effector domain*), która umożliwia połączenie prokaspazy-8 z odcinkiem DED. Kaspaza-8 po aktywacji stymuluje kaspazy efektorowe odpowiedzialne za apoptozę komórek (24, 25). Obserwowany zatem w przeprowadzonych badaniach wzrost kaspazy-8 potwierdza aktywujący wpływ propolisu na apoptozę.

## Wnioski

1. Etanolowy ekstrakt propolisu (EEP) wykazywał działanie proapoptotyczne na komórki nowotworowe ludzkiego czerniaka złośliwego Me45 oraz ludzkiego raka okrężnicy Hct-116.
2. Wzrost apoptozy zależał od stężenia EEP w płynach hodowlanych (był większy w obecności wyższego stężenia).
3. Uzyskane wyniki wskazują na wyższą wrażliwość komórek raka okrężnicy Hct-116 na zastosowany apiterapeutyk niż komórek czerniaka złośliwego Me45.

## Piśmiennictwo

1. Epstein RJ. Human molecular biology: an introduction to the molecular basic of health and disease. Cambridge University Press, Cambridge 2005; 390-9.
2. 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 2007; 6:483-7.
3. Kędzia B. Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych. Herba Pol 2008; 54(5):179-86.
4. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2(1):29-32.
5. Kędzia B, Hołderna- Kędzia E. Wykorzystanie miodu i propolisu w zakażeniach. Post Fitoter 2009; 4:202-6.
6. Kędzia B. Skład chemiczny propolisu polskiego. Cz. I. Początkowy okres badań. Post Fitoter 2009; 1:39-44.
7. Kędzia B. Skład chemiczny propolisu polskiego. Cz. II. Nowe badania. Post Fitoter 2009; 2:122-8.
8. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Produkty pszczoł w medycynie. Spółdz Pszczel Apis, Lublin 2007; 25-38.
9. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopes J i wsp. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. J Food Sci 2008; 9(73):117-124.
10. Kędzia B. Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. Post Fitoter 2006; 1:23-35.
11. Salantino A, Weinstein-Texeira E, Negri G i wsp. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 2(1):33-8.
12. Stojko A. Leczenie produktami pszczelimi (apiterapia). W: Medycyna naturalna (red. Janicki K, Rewerski A). Wyd Lek PZWL, Warszawa 2001; 105-13.
13. TramAnh P, Xiao-Min Y, Muthusamy K i wsp. Antiproliferative effect of chrysin on anaplastic thyroid cancer. J Surg Res 2011 (article in press).
14. Bednarek I, Sypniewski D, Solarz J i wsp. Zmiany w indukcji apoptozy komórek linii nowotworowej HeLa za pomocą etopozydu w obecności oligonukleotydu antysensownego dla mRNA genu Bcl-2. Wiad Lek 2008; 61:97-106.
15. Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY i wsp. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity. J Cell Physiol 2009; 221(3):642.
16. Li F, Awale S, Tezuka Y i wsp. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. J Nat Prod 2010; 73(4):623-7.
17. Chen MJ, Chang WH, Lin CC

i wsp. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatol* 2008; 8(6):566-76. **18.** Seda-Vatansever H. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 2010; 112:546-64. **19.** Chen CN, Wu CL, Lin JK. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:53-66. **20.** Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J i wsp. Ethanol extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009. **21.** Szliszka E, Czuba ZP, Domino M i wsp. Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 2009; 14:738-54. **22.** Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B i wsp. Chalcones enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Mol Sci* 2010; 11:1-13. **23.** Bronikowska J, Szliszka E, Czuba ZP i wsp. The combination of TRAIL and isoflavones enhances apoptosis in cancer cells. *Molecules* 2010; 15, 2000-15. **24.** Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35:495-516. **25.** Zhang A, Wu Y, Lai HWL i wsp. Apoptosis – a brief review. *Neurobiol* 2004; 3:47-5.

otrzymano/received: 14.10.2011  
zaakceptowano/accepted: 07.11.2011

Adres/address:  
\*dr farm. 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) 364-13-54  
e-mail: rkubina@sum.edu.pl