

## Bezpieczeństwo cytologiczne i aktywność mikrobiologiczna preparatu kwasu fulwowego (FTM-A50) w postaci Alkaliny - raport z badań wstępnych

Badania wykonane w ramach projektu Science Hub przez dr Marcina Włodarczyka, mgr Jolantę Kalinowską, pod kierunkiem dr Karoliny Rudnickiej (Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Polska)

Okres realizacji: maj-sierpień 2023 r.

### I. OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI KWASÓW FULWOWYCH

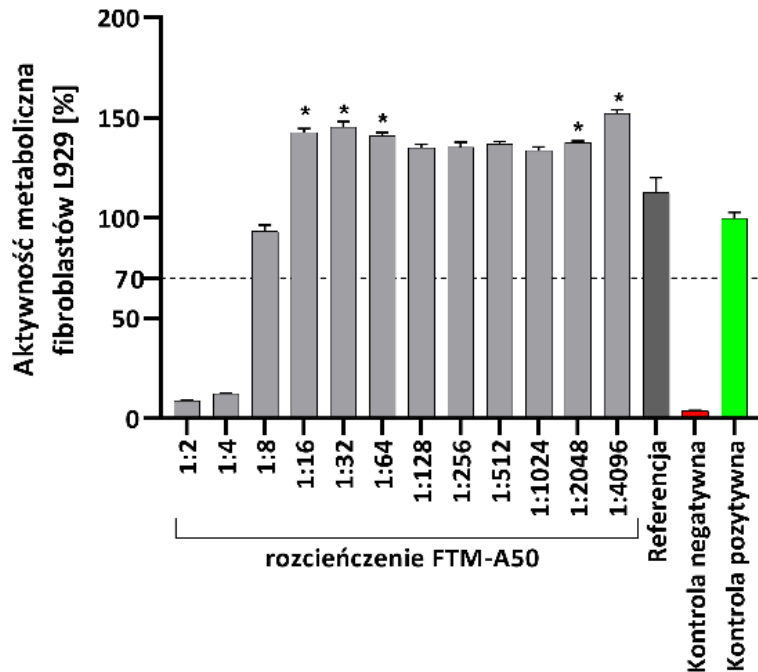
**Cel.** Ocena cytozgodności kwasu fulwowego w postaci suplementu -Alcalina - FAF oraz wykluczenie stężeń wpływających na żywotność komórek w hodowlach *in vitro*. Potencjalna cytotoksyczność może wpływać na wyniki dalszych testów biologicznych *in vitro* i może ograniczać zastosowania biomedyczne.

**Materiały i metody.** Badania cytotoksyczności przeprowadzono przy użyciu fibroblastów mysich (L929, ATTC, Rockville, MD, USA) zalecanych przez Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ISO-10993-5-2009) do testowania składników o potencjalnym zastosowaniu w biomedycynie. Jest to standardowy model stosowany w badaniach biokompatybilności *in vitro* ze względu na jego stabilność, optymalny okres podziału i adherentny wzrost. Fibroblasty myszy hodowano w pożywce RPMI-1640 (Sigma Aldrich) uzupełnionej inaktywowaną surowicą bydlęcą (Cytogen, Polska) i antybiotykami: penicyliną (100 U/ml) i streptomycyną (100 µg/ml) w standardowych warunkach inkubatora hodowli komórkowej (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, >90% wilgotności). Zawiesinę komórek naniesiono na 96-dołkową płytkę do hodowli komórkowej i inkubowano przez noc (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, >90% wilgotności) w celu przylegania komórek do powierzchni naczynia hodowlanego i odtworzenia monowarstw komórek. Po inkubacji w 96-dołkowej płytce, hodowle komórkowe obserwowano przy użyciu odwróconego mikroskopu, aby upewnić się, że tworzą one zwarte i jednorodne monowarstwy. Pożywkę zastąpiono 100 µl świeżej pożywki hodowlanej. Następnie do wybranych dołków dodawano seryjne rozcieńczenia Alkaliny - (FTM-A50) (w trzech powtórzeniach) w pożywce RPMI-1640 w zakresie rozcieńczeń: 1:2-1:4096. Uwzględniono następujące kontrole: kontrolę żywotności (komórki w medium hodowlanym bez dodatku badanego związku) oraz kontrolę cytotoksyczności (K-), czyli komórki traktowane 2% roztworem saponiny - substancji o silnych właściwościach cytotoksycznych. Tak przygotowane hodowle inkubowano przez 24 godziny (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, > 90% wilgotności). Po inkubacji stan komórek obserwowano pod mikroskopem świetlnym i odnotowywano wszelkie zmiany w ich morfologii.

Procedura testu MTT była następująca. Po całonocnej inkubacji komórek z badanym kwasem fulwowym, do każdej studzienki wprowadzano 20 µl odczynnika MTT (Sigma Aldrich) w stężeniu 5 mg/ml i inkubowano przez 4 godziny (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, > 90% wilgotności). W kolejnym kroku płytki odwirowano (1400 obr./min, 10 min.), a supernatanty usunięto i zastąpiono 150 µl DMSO i 25 µl buforu glicynowego na każdy dołek. Po jednonumutowej inkubacji w temperaturze pokojowej i wytrząsaniu na wirniku vortex, zmierzono absorbancję przy 570 nm przy użyciu czytnika Multiskan EX (Thermo Scientific).

**Wyniki i ich interpretacja.** Zgodnie z normami ISO składnik, który nie wywołuje cytotoksyczności przekraczającej 30% martwych komórek, należy uznać za niecytotoksyczny. W oparciu o to kryterium, jeśli żywotność komórek po 24-godzinnej ekspozycji na Alcalinę (w określonym stężeniu) utrzymuje się powyżej 70%, należy go uznać za cytozgodny (Ryc. 1.). Preparat wykazuje bezpieczeństwo cytologiczne powyżej rozcieńczenia 1:32. FAF ma najwyższą cytokompatybilność, ponieważ tylko rozcieńczenia 1:2-1:4 FAF znacząco wpłynęły na żywotność komórek. Co ciekawe, zaobserwowano stymulację proliferacji komórek lub zwiększenie ich aktywności metabolicznej dla FAF dla wysokich (1:16-1:64) i niskich stężeń FAF (1:1024-1:4096). Biorąc pod uwagę stężenie Alkaliny stosowane u ludzi testowany preparat należy uznać za cytokompatybilny. Inni autorzy wykazali, że kwas fulwowy w zakresie stężeń 0,001-10 µg/ml nie wpływał na żywotność linii komórek bazofilnych (<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60702>), a w stężeniu 100 µg/ml wpływał na żywotność obniżając ją tylko o 10%. Wykazano również na modelu mysim i szczurzym w

złożonych badaniach toksykologicznych, że suplementacja kwasem fulwowym w dawce 5000 mg/kg masy ciała/dzień FA została uznana za bezpieczną i nie zaobserwowano żadnego poziomu działania niepożądanego (NOAEL) (<https://doi.org/10.1155/2020/8899244>).



**Ryc. 1.** Aktywność proliferacyjna/metaboliczna fibroblastów L929 poddanych działaniu Alcaliny w porównaniu z hodowlami komórkowymi prowadzonymi w samym podłożu\*. Analiza statystyczna przeprowadzona w testach U-Manna Whitneya w oprogramowaniu STATSOFT (\* $p < 0,05$ , w stosunku do kontroli pozytywnej).

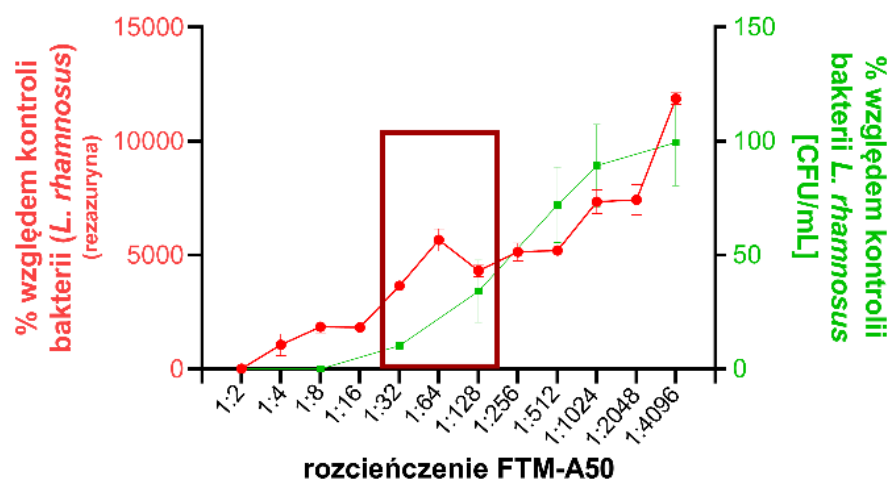
## I. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa FAF

**Cel.** Określenie, czy FAF wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec najczęstszych czynników zakaźnych wywołujących zakażenia u ludzi poprzez zliczanie jednostek tworzących kolonie (CFU) i aktywność mikrobiologiczną (redukcja resazuryny).

**Material i metody.** W teście wykorzystano cztery szczepy bakterii wyizolowane z gruczołu mlekowego bydła: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*. Zawiesinę bakterii o gęstości  $\sim 1 \times 10^8$  CFU/ml rozcieńczono 100-krotnie w bulionie Mueller Hinton. Początkowe inokulum bakteryjne наносono następnie do studzienek 96-dołkowych płytek hodowlanych zawierających szereg rozcieńczeń Alcaliny w objętości 100  $\mu$ l/dołek (końcowa objętość 200  $\mu$ l) i inkubowano w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych, przez 20 $\pm$ 2 godziny. Aby określić liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) po inkubacji z Alcaliną, 100  $\mu$ l z każdego dołka wysiano na stałe płytki agarowe, inkubowano przez noc, a CFU obliczono i porównano z kulturą kontrolną bez FAF. Jednocześnie wpływ na aktywność/żywołność drobnoustrojów oceniano za pomocą testu redukcji resazuryny. Test resazuryny (test Alamar Blue) jest prostym, szybkim i czułym pomiarem, np. bakterii. Żywe komórki są aktywne metabolicznie i mogą redukować niefluorescencyjny barwnik resazurynę poprzez reduktazę mitochondrialną do silnie fluorescencyjnego barwnika resorufiny. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do liczby żywych komórek bakteryjnych. Test został skonfigurowany dokładnie w taki sam sposób jak CFU; jednak resazuryna została dodana do kultur inkubowanych z FAF w objętości 20  $\mu$ l / studzienkę zamiast wysiewania płynów na płytki agarowe. Następnie inkubowano w temperaturze 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> przez 30 minut, a fluorescencję mierzono przy długości fali wzbudzenia 550 nm i długości fali emisji 590 nm za pomocą wielomodowego czytnika płytek.

**Wyniki.** Wykazano, że preparat FAF nie hamuje aktywności drobnoustrojów. W metodzie CFU i wynikach opartych na AlamarBlue zaobserwowaliśmy taką samą liczbę i aktywność bakterii w środowisku FAF, jak w kontroli (bez FAF). Nie ma dostępnych danych na temat działania przeciwdrobnoustrojowego czystego, niezolowanego FA. Wykazano jednak, że preparat wykazuje silną aktywność przeciwko różnym patogenom bakteryjnym i grzybiczym o minimalnym stężeniu hamującym równym lub mniejszym niż 0,5%. Oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego zaobserwowano lepsze gojenie się ran po leczeniu CHD-FA, co wykazano na podstawie pomiaru powierzchni rany, badania histopatologicznego i profilowania ekspresji genów gojenia się ran, a także uwalnianych cytokin (DOI: [10.1097/TA.0000000000000737](https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000737)).

W dalszych badaniach wykazaliśmy, indukowaną kwasem fulwowym ekspansję *Lactobacillus rhamnosus* w porównaniu do kontroli bez Alcaliny w zakresie stężeń: 1:32-1:128 (Ryc. 2, czerwony prostokąt).



**Ryc. 2.** Wpływ Alcaliny na aktywność metaboliczną (czerwona linia) i CFU (zielona linia) *L. rhamnosus* (porównanie testu rezazuryny i analizy CFU).

Jedno z badań przeprowadzone na modelu ryby z rodziny piskorzowatych (*Cobitidae*) w akwariach eksperymentalnych koncentrowało się wyłącznie na wpływie suplementacji diety kwasem fulwowym na aktywność trawienną jelit (analiza enzymatyczna), aktywność przeciwutleniającą, aktywność enzymów odpornościowych i skład mikroflory w 60-dniowej próbie karmienia. Wykazano, że optymalne zapotrzebowanie na kwas fulwowy w diecie dla maksymalnego wzrostu wynosi 16,4 g na kg diety. Suplementacja kwasem fulwowym spowodowała wzrost populacji bakterii z grupy *Firmicutes* i *Actinobacteria*, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczebności *Proteobacteria*. Wyniki wskazały, że suplementacja kwasem fulwowym spowodowała zmniejszenie względnej liczebności *Serratia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* i *Edwardsiella* oraz względny wzrost ilości *Lactobacillus* w jelicie (DOI: [10.1016/j.fsi.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.008)). Nie ma dostępnych danych, które potwierdziłyby to zjawisko na modelu myszy, szczura lub świnki morskiej.

**Podsumowanie.** Badania innych autorów wykazały, że przyjmowanie kwasów fulwowych, na przykład wraz z dietą, może korzystnie wpływać na funkcjonowanie całego organizmu. Suplementacja tych związków pozytywnie wpływa na działanie komórek układu odpornościowego, powodując m.in. stymulację monocytów, czyli komórek układu odpornościowego m.in. odpowiadających za redukcję stanów zapalnych w organizmie (Chien i in. 2015). Ponadto wyniki badań wskazują, że FA ma właściwości antyoksydacyjne, co może powodować, że związek ten jest bardzo dobrym kandydatem na naturalne źródło antyoksydantów wykorzystywane zarówno w przemyśle farmaceutycznym, jak i spożywczym (Cardenas i in. 2011). Chroni również przed niekorzystnym wpływem metali ciężkich

zmniejszając ich wchłanianie, co zostało wykazane na przykładzie kadmu w modelu zwierzęcym (Kumar, Sekar 2018). Kwas fulwowy wpływa również na wchłanianie różnych substancji, w tym składników odżywczych, witamin, a nawet leków. Wykazano, że w obecności FA wzrosła absorpcja minerałów. Spowodowane jest to wiązaniem się substancji mineralnych z kwasem poprzez chelatowanie, a nie tworzenie kompleksów, co może mieć zwiększać rozpuszczalność tych związków. Jeżeli chodzi o witaminy oraz leki, to należy zauważyć, że w obecności FA zauważono zmniejszone wchłanianie tych substancji (Willis 2015). Oprócz wyżej wymienionych kwas fulwowy przynosi wiele innych korzyści zdrowotnych, co powoduje, że preparat Alcalina może być dobrym rozwiązaniem, jeżeli chodzi o suplementację FA w codziennej diecie.

## Bibliografia

- 1) Chien SJ, Chen TC, Kuo HC, Chen CN, Chang SF. Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes. *BMC Complement Altern Med.* 2015 Mar 13;15:61. doi: 10.1186/s12906-015-0583-x. PMID: 25888188; PMCID: PMC4369892.
- 2) Cardenas, Noemi & Coballase-Urrutia, Elvia & Gertrudis, Bernardino & Chaverri, Jose & Barragan, Gerardo. (2011). Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *Journal of Food, Agriculture and Environment.* 9. 123-127.
- 3) Kumar, Deeptha & Sekar, Sasikala. (2018). Titrimetric estimation of fulvic acid substances in Oriens Shilajit as a part of herbal nutraceutical standardization. 198-199.
- 4) Kirsten Willis. 2015. An investigation of the effects of fulvic and humic acids on the absorption of selected drugs, vitamins and minerals using the everted mouse gut model.

-----KONIEC RAPORTU-----

dr Karolina Rudnicka



W imieniu zespołu Science Hub (dr Marcin Włodarczyk i mgr Jolanta Kalinowska)