



Jesteśmy częścią sieci
European University of
Post-Industrial Cities (UNIC)



Bezpieczeństwo cytologiczne i aktywność mikrobiologiczna preparatu Fulvi PETS zawierającego kwas fulwowy (FTM-L50) - raport z badań wstępnych

Wykonane w ramach projektu Science Hub przez dr Marcina Włodarczyka, mgr Jolantę Kalinowską i 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

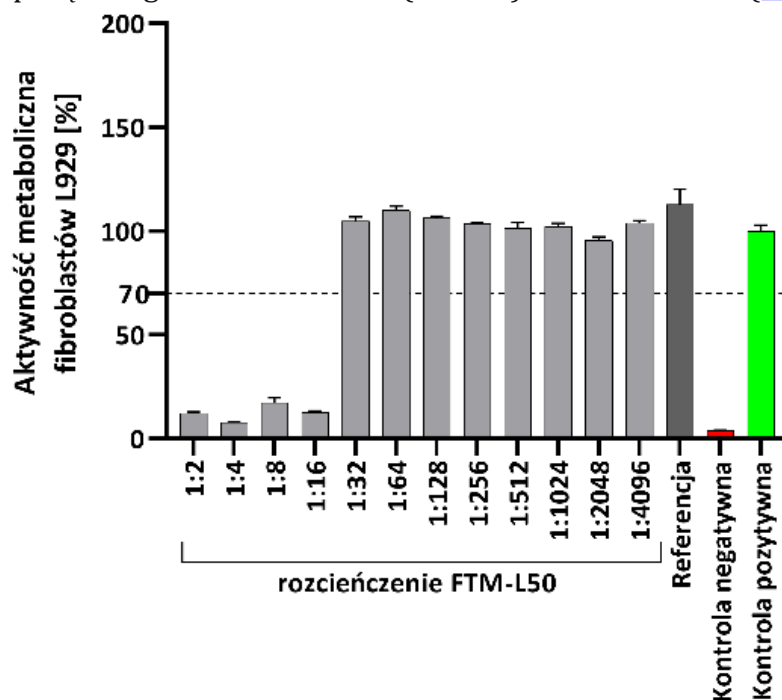
Cel. Ocena cytozgodności produktu zawierającego preparat kwasu fulwowego - FTM-L50 (główny składnik produktów FULVI PETS) oraz wykluczenie stężeń wpływających na żywotność komórek w hodowlach *in vitro*. Potencjalna cytotoksyczność może wpływać na wyniki dalszych testów biologicznych *in vitro* i może ograniczać zastosowania biomedyczne.

Materialy 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% CO₂, >90% wilgotności). Zawiesinę komórek naniesiono na 96-dołkową płytkę do hodowli komórkowej i inkubowano przez noc (5% CO₂, 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 badanego preparatu FULVI PETS (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% CO₂, 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 badanymi kwasami fulwowymi, do każdej studzienki wprowadzano 20 µl odczynnika MTT (Sigma Aldrich) w stężeniu 5 mg/ml i inkubowano przez 4 godziny (5% CO₂, 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 jednodominutowej 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 wyższej niż 30% martwych komórek, należy uznać za niecytotoksyczny. W oparciu o to kryterium, jeśli żywotność komórek po 24-godzinnej ekspozycji na FTM-L50

utrzymuje się powyżej 70%, należy go uznać za cytokompatybilny (Ryc. 1.). Preparat wykazuje bezpieczeństwo cytologiczne powyżej rozcieńczenia 1:32. **FTM-L50** pozostaje cytokompatybilny odpowiednio powyżej 1:16 i 1:32. Biorąc pod uwagę końcowe rozcieńczenie gotowych do użycia produktów Fulvi Pets, testowany preparat należy uznać za cytokompatybilny. Inni autorzy wykazali, że kwas fulwowy w zakresie stężeń 0,001-10 ug/ml nie wpływał na żywotność linii komórek bazofilnych (<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60702>), a w stężeniu 100 ug/ml wpływał na żywotność tylko o 10%. Wykazano również na modelu mysim i szczurzym w złożonych badaniach toksykologicznych, że suplementacja FA (ang. fulvic acid) 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 kwasu fulwowego w porównaniu z kontrolnymi hodowlami komórkowymi*. Analiza statystyczna przeprowadzona w testach U-Manna Whitneya w oprogramowaniu STATSOFT (* $p < 0,05$, w stosunku do kontroli pozytywnej).

I. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa FTM-L50

Cel. Określenie, czy FTM-L50 wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec czynników zakaźnych wywołujących m.in. zakażenia weterynaryjne 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 nanoszono następnie do studzienek 96-dołkowych płytek hodowlanych zawierających testowany FTM-L50 w objętości 100 μ l/dołek (końcowa objętość 200 μ 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 FULVI PETS (różne rozcieńczenia), 100 μ l z każdego dołka wysiano na stałe płytki



agarowe, inkubowano przez noc, a CFU obliczono i porównano z kulturą kontrolną bez preparatu FULVI PETS. Jednocześnie wpływ na aktywność/żywość 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 FTM-L50w objętości 20 μ l / studzienkę zamiast wysiewania płynów na płytki agarowe. Następnie inkubowano w temperaturze 37 °C, 5% CO₂ 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 Fulvi Pets nie hamuje aktywności drobnoustrojów (dane nie pokazane). W metodzie CFU i wynikach opartych na AlamarBlue zaobserwowaliśmy taką samą liczbę i aktywność bakterii w środowisku FTM-L50, jak w kontroli (bez FTM-L50). Nie ma dostępnych danych na temat działania przeciwdrobnoustrojowego, nieizolowanego FA. Wykazano jednak, że FA pochodzące z węglowodanów (CHD-FA) wykazywały 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)).

Wykazaliśmy, że indukowaną kwasem fulwowym ekspansję *Lactobacillus rhamnosus* w porównaniu do kontroli bez FTM-L50 w zakresie stężeń: 1:32-1:128 (Ryc. 2, czerwony prostokąt). Jedno z badań na modelu ryb z rodziny piskorzowatych 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 liczebności sekwencji *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)).

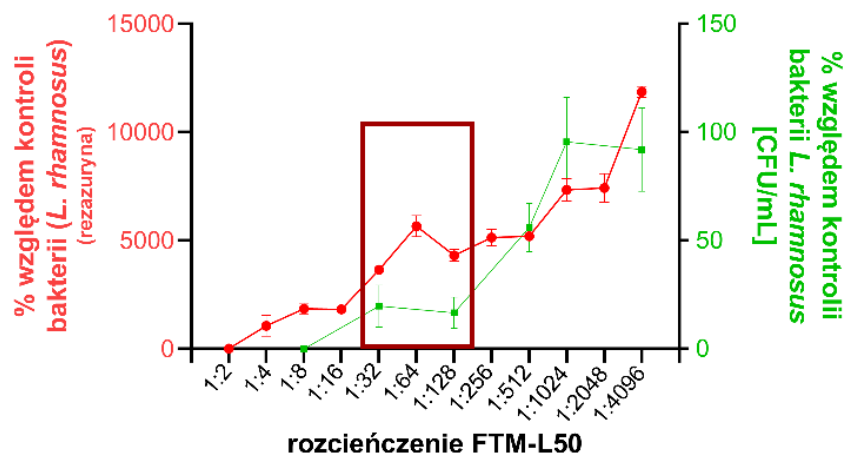


Fig. 2. Wpływ kwasu fulwowego na aktywność metaboliczną (czerwona linia) i CFU (zielona linia) *L. rhamnosus* (porównanie testu rezazuryny i analizy CFU).

Podsumowanie. Badania innych autorów wykazały, że suplementacja kwasów fulwowych może przynosić wiele korzyści dla zdrowia zwierząt domowych, w tym psów i kotów. Wpływa pozytywnie na funkcjonowanie wątroby. Ma działanie antibakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwzapalne. Kwas fulwowy zastosowany w preparatach marki FULVI PETS może wspierać również działanie układu odpornościowego zwierząt domowych. Może powodować lepsze przyswajanie składników odżywczych oraz witamin z diety, co może wpływać na poprawę zdrowia zwierzęcia. Jest silnym antyoksydantem oraz chroni przed wchłanianiem się metali ciężkich występujących w środowisku, które mogą być przyjmowane przez zwierzę np. wraz z wodą (Islam i in. 2005, Trckova i in. 2005, Lawley i in. 2013). Zatem kwas fulwowy zastosowany w preparatach marki FULVI PETS może być dobrym sposobem na utrzymanie w dobrej kondycji zdrowia zwierząt domowych. .

Bibliografia:

1. Trckova M., Maltova L., Hudcova H., Faldyna M., Zraly Z., Dvorska L., Beran V., Pavlik I. 2005. Peat as a feed supplement for animals: a review. *Veterinary Research Institute*. 50(8): 361–377.
2. S, Lawley & Gupta, Ramesh & JT, Goad & Canerdy, Terry & SR, Kalidindi. 2013. Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Efficacy and Safety of Purified Shilajit in Moderately Arthritic Dogs. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*. 1. 10.15744/2348-9790.1.302.
3. K.M.S, Islam & A, Schumacher & Gropp, Jürgen. 2005. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4. 10.3923/pjn.2005.126.134.

-----**KONIEC RAPORTU**-----

dr Karolina Rudnicka

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