



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



## **Bezpieczeństwo cytologiczne i aktywność mikrobiologiczna preparatów kwasu fulwowego (terra+ alkaline i terra+ minerals) - 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**

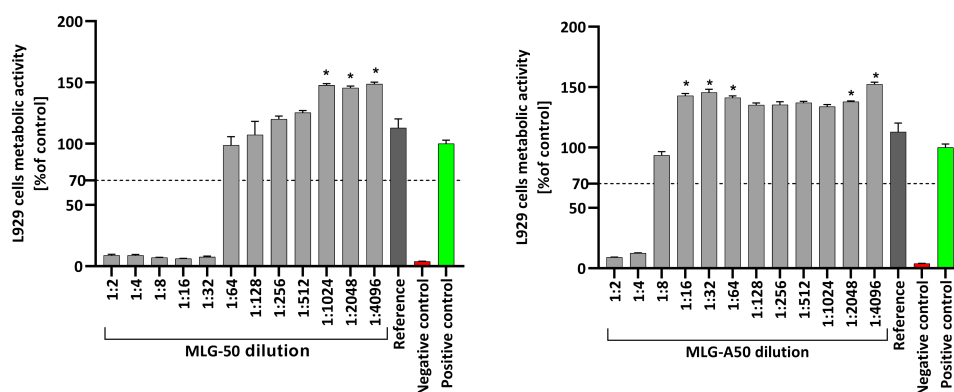
**Cel.** Ocena cytozgodności produktów zawierających preparat kwasu fulwowego - (**terra+ alkaline i terra+ minerals**) oraz wykluczenie stężeń wpływających na żywotność komórek w hodowlach *in vitro*. Potencjalna cytotoxiczność może wpływać na wyniki dalszych testów biologicznych *in vitro* i może ograniczać zastosowania biomedyczne.

**Materiały i metody.** Badania cytotoxiczności 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 badanych kwasów fulwowych (w trzech powtórzeniach każdy) 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 cytotoxiczności (K-), czyli komórki traktowane 2% roztworem saponiny - substancji o silnych właściwościach cytotoxicznych. 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 badanymi kwasami fulwowymi, 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 jednogodzinowej 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 cytotoxiczności wyższej niż 30% martwych komórek, należy uznać za niecytotoxiczny. W oparciu o to kryterium, jeśli żywotność komórek po 24-godzinnej ekspozycji na **terra+ alkaline i terra+ minerals** utrzymuje się powyżej 70%, należy je uznać za cytocompatybilne

(Ryc. 1.). Wszystkie preparaty wykazują bezpieczeństwo cytologiczne powyżej rozcieńczenia 1:32. **terra+ alkaline** ma najwyższą cytokompatybilność, ponieważ tylko rozcieńczenia 1:2-1:4 **terra+ alkaline** znacząco wpłynęły na żywotność komórek. **terra+ minerals** pozostaje cytokompatybilny odpowiednio powyżej 1:16 i 1:32. Co ciekawe, **terra+ minerals** w niskich stężeniach (rozcieńczenie: 1:1024-1:4096) stymulował proliferację komórek lub zwiększał ich aktywność. Jednak podobny efekt zaobserwowano dla **terra+ alkaline** dla wysokich (1:16-1:64) i niskich stężeń **terra+ minerals** (1:1024-1:4096). Biorąc pod uwagę końcowe rozcieńczenie gotowych do użycia produktów **terra+ alkaline i terra+ minerals**, wszystkie testowane preparaty należy uznać za cytozgodne. 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 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>). Nie ma danych na temat wpływu FA na proliferację/aktywność metaboliczną komórek zwierzęcych lub ludzkich. Wykazano jednak, że FA zwiększają tempo proliferacji u roślin (*Abies cephalonica*), szczególnie we wczesnych dniach pobierania próbek (doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.024).



**Ryc. 1.** Aktywność proliferacyjna/metaboliczna fibroblastów L929 poddanych działaniu **terra+ alkaline i terra+ minerals** 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 **terra+ alkaline i terra+ minerals**

**Cel.** Określenie, czy **terra+ alkaline i terra+ minerals** wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec najczęstszych czynników zakaźnych wywołujących zakażenia u ludzi poprzez zliczanie jednostek tworzących kolonie (CFU) i aktywność mikrobiologiczną (redukcja resazury).

**Materiał 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 **terra+ alkaline i terra+ minerals** w objętości 100  $\mu$ l/dołek (końcowa objętość 200  $\mu$ l) i inkubowano w



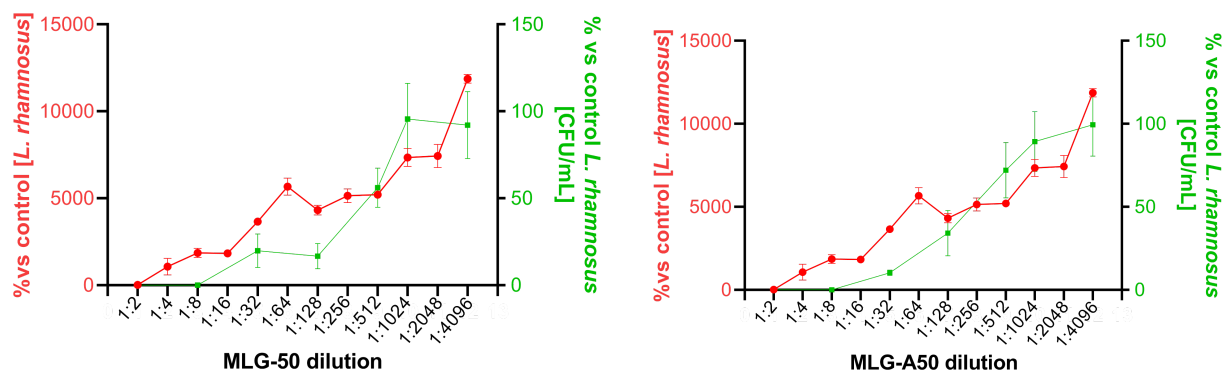
Jesteśmy częścią sieci  
European University of  
Post-Industrial Cities (UNIC)



temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych, przez 20±2 godziny. Aby określić liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) po inkubacji z **terra+ alkaline i terra+ minerals** (różne rozcieńczenia), 100 ul z każdego dołka wysiano na stałe płytki agarowe, inkubowano przez noc, a CFU obliczono i porównano z kulturą kontrolną bez **terra+ alkaline i terra+ minerals**. 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 zredukować 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 **terra+ alkaline i terra+ minerals** w objętości 20 µl / 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 żaden z preparatów **terra+ alkaline i terra+ minerals** nie hamuje aktywności drobnoustrojów (dane nie pokazane). W metodzie CFU i wynikach opartych na AlamarBlue zaobserwowaliśmy taką samą liczbę i aktywność bakterii w środowisku **terra+ alkaline i terra+ minerals**, jak w kontroli (bez **terra+ alkaline i terra+ minerals**). Nie ma dostępnych danych na temat działania przeciwdrobnoustrojowego czystego, 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 **terra+ alkaline i terra+ minerals** (1:32-1:128) powoduje nasilenie wzrostu bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* w porównaniu do kontroli. 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 sugerują, 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)).



**Ryc. 2.** Wpływ kwasu fulwowego **terra+ alkaline** i **terra+ minerals** na aktywność metaboliczną (czerwona linia) i CFU (zielona linia) *L. rhamnosus* (porównanie testu rezazuryny i analizy CFU).

**Podsumowanie.** Suplementacja kwasów fulwowych pozytywnie wpływa na działanie układu odpornościowego powodując stymulację monocytów- komórek układu odpornościowego, redukując tym samym stany zapalne w organizmie (Chien i in. 2015). Inni autorzy wykazali również, że FA ma właściwości antyoksydacyjne, co może powodować, że związek ten jest bardzo dobrym kandydatem na naturalne źródło antyoksydantów, z których pożytek mogą czerpać zarówno przemysł farmaceutyczny, jak również spożywczy (Cardenas i in. 2011). Kwas fulwowy chroni również przed niekorzystnym wpływem metali ciężkich, występujących w środowisku np. w wodzie, zmniejszając ich wchłanianie, co zostało ukazane na przykładzie pierwiastka ciężkiego- kadm w modelu zwierzęcym (Kumar, Sekar 2018). Wykazano również różnice w stopniu absorpcji substancji niezbędnych organizmowi, takich jak witamin czy minerałów, a dodatkowo również leków. Zauważono, że w obecności FA wzrosła absorpcja minerałów, co może być spowodowane wiązaniem się ich z kwasem fulwowym poprzez chelatowanie, a nie tworzenie kompleksów, co ma prawdopodobnie wpływ na ich rozpuszczalność. Jeżeli chodzi o witaminy i leki to warto zauważyć, że obecność kwasu fulwowego zmniejszała ich wchłanianie (Willis 2015). Oprócz wyżej wymienionych FA przynosi wiele korzyści zdrowotnych i przyjmowanie go wraz z dietą na przykład w formie suplementacji może korzystnie wpływać na funkcjonowanie całego organizmu.

## Bibliografia

1. Chien SJ, Chen TC, Kuo HC, Chen CN, Chang SF. 2015. Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes. *BMC Complement Altern Med.* 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-----



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



*dr Karolina Rudnicka*

A handwritten signature in blue ink that reads 'Karolina Rudnicka'.

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