

Wpływ propolisu na rozwój danio przegowanego (*Danio rerio*)

Streszczenie: Badaniu poddano 150 embrionów danio przegowanego (*Danio rerio*). Po 24 h od dodania propolisu oceniono śmiertelność rozwijających się embrionów. Zauważono, że po tym czasie ekspozycji badany propolis w stężeniach $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ wywołuje 100% śmiertelność wśród embrionów danio przegowanego, w stężeniu $30 \mu\text{g/ml}$ 93%, $10 \mu\text{g/ml}$ 33%, natomiast niższe stężenia nie spowodowały zamierania zarodków. Co ciekawe w stężeniu $30 \mu\text{g/ml}$ i $10 \mu\text{g/ml}$ zauważono wyraźnie opóźnienie w rozwoju osobniczym, co może sugerować antyproliferacyjny bądź proapoptotyczny efekt propolisu. W 48 h oraz 72 h po dodaniu propolisu oceniono częstotliwość skurczów serca embrionów. Zauważono, że w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ częstotliwość uderzeń serca była niższa o 42%. Hamujący wpływ na rozwój zarodka jest interesującym aspektem działania propolisu, który zostanie zbadany dokładniej w planowanych następnych badaniach.

Wstęp

Propolis jest substancją gromadzoną przez robotnice pszczół (*Apis mellifera*) z pączków kwiatowych roślin. Owady wykorzystują propolis do zmniejszania szczelin oraz uszczelniania ula. W jego składzie zidentyfikowano ponad 300 składników. Dominującą grupą są związki fenolowe oraz flawonoidy [Sokół i Michalczyk 2012]. Znalazł zastosowanie w medycynie ludowej. Badania wykazały jego liczne pozytywne właściwości m.in. zdolności przeciwbakteryjne, przeciw-wirusowe, przeciwzapalne oraz przeciwnowotworowe [Popova i inni 2017]. Wymienione właściwości spowodowały, że propolis jest coraz częstszym obiektem badań naukowców. Do badań wykorzystano embriony danio przegowanego (*Danio rerio*), który stał się ostatnio bardzo popularnym organizmem modelowym w badaniach naukowych.

Celem prezentowanych badań było sprawdzenie, jaki wpływ na rozwój danio przegowanego ma propolis.

Materiały i metody

Do przeprowadzenia badania został użyty etanolowo-wodny wyciąg propolisu z rejonu Lubelszczyzny, rozpuszczony w DMSO oraz szczep dziki [Tuebingen,

Tu] danio pręgowanego (*Danio rerio*). Wyselekcjonowano embriony niewykazujące odchyłań w budowie oraz rozwoju. Na podstawie *Fish Embryo Toxicity Assay* [Braunbeck i in. 2006] określono wiek embrionów na 3 h od zapłodnienia. Wyodrębniono grupę kontrolną oraz 9 grup badanych, w każdej umieszczono 15 embrionów, które zostały poddane działaniu wybranych stężeń propolisu (tab. 1). Stężenie DMSO w każdym roztworze wynosiło 0,1%. Embriony podczas rozwoju przechowywano w cieplarni w temperaturze 28,5°C. Zmiany w embriogenezie obserwowano co 24 h od dodania propolisu.

Tabela 1. Dane metodyczne

Nr grupy	Stężenie
1	kontrola
2	3000 µg/ml
3	1000 µg/ml
4	300 µg/ml
5	100 µg/ml
6	30 µg/ml
7	10 µg/ml
8	3 µg/ml
9	1 µg/ml
10	0,3 µg/ml

Źródło: opracowanie własne

Wyniki badań i dyskusja

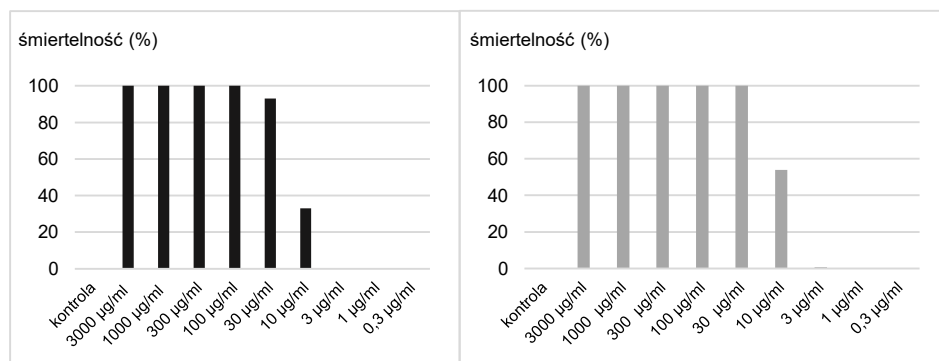
Po 24 h po podaniu roztworu propolisu określono śmiertelność embrionów w danych grupach (rys. 1). Śmiertelność wynosząca 100% występowała u embrionów umieszczonych w roztworach o stężeniu ≥ 100 µg/ml. W stężeniu 30 µg/ml wynosiła 93%, a w 10 µg/ml wynosiła 33%. W niższych stężeniach nie zaobserwowano martwych embrionów.

Po 48 h po podaniu roztworu propolisu określono śmiertelność embrionów w danych grupach względem liczby początkowej: w stężeniach ≥ 30 µg/ml wynosiła 100%, a w stężeniu 10 µg/ml 54%, w stężeniu 3 µg/ml 0,7% (rys. 2). W niższych stężeniach nie zaobserwowano martwych embrionów. Po 72 h od podania propolisu nie zaobserwowano różnicy w śmiertelności embrionów.

Po 24 h od dodania propolisu oceniono morfologię embrionów. Zauważono, że rozwój embrionów w stężeniach 30 µg/ml oraz 10 µg/ml roztworu propolisu różnił się od próby kontrolnej. Zauważono, że rozwój osobniczy w tych dawkach był zdecydowanie opóźniony i embriony wyglądały na stadium 8-10 somitów (ok. 12 godzin po zapłodnieniu). Stopień rozwoju embrionów w stężeniach ≤ 3 µg/ml nie wykazywał różnic w stosunku do grupy kontrolnej (rys. 3).

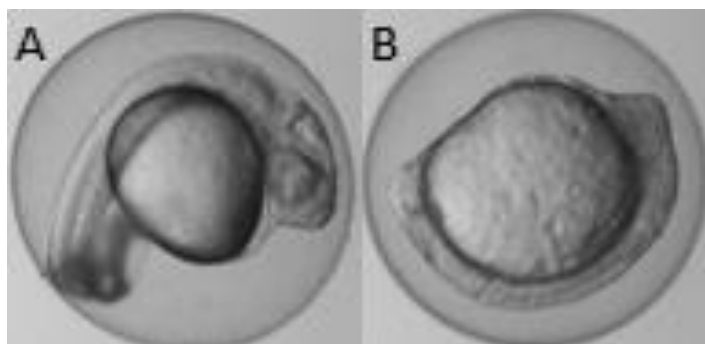
Po 48 h ekspozycji na propolis oceniono ilość wylęgniętych larw. W próbie kontrolnej wylęło się 5/15 (33,3%) larw, w stężeniu 3 $\mu\text{g/ml}$ 7/14 (50%), w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ 6/15 (40%), w stężeniu 0,3 $\mu\text{g/ml}$ 2/15 (13,3%). W dawkach 30 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 $\mu\text{g/ml}$ żadna larwa się nie wykluła (rys. 4). Po 72 h ponownie oceniono wylęgowość larw. W próbie kontrolnej wylęło się 15/15 larw (100%), w grupie o stężeniu 3 $\mu\text{g/ml}$ 14/14 (100%), w grupie o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ 10/15 (66,6%), a w grupie o stężeniu 0,3 $\mu\text{g/ml}$ 15/15 (100%) (rys. 5).

Po 48 h policzono częstotliwość uderzeń rozwijającego się serca. Dla grupy kontrolnej wynosiła 150 uderzeń, dla stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$ 59 uderzeń, a dla stężenia 3 $\mu\text{g/ml}$ 142 uderzenia, 1 $\mu\text{g/ml}$ – 141 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ – 140 uderzeń na minutę. Po 72 h policzono częstotliwość uderzeń serca w ciągu minuty. Dla grupy kontrolnej wynosiła 158 uderzeń, dla stężenia 3 $\mu\text{g/ml}$ – 167 uderzeń, dla stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$ – 161 uderzeń, dla stężenia 0,3 $\mu\text{g/ml}$ – 153 uderzenia w ciągu minuty. Po 72 h zaobserwowano w stężeniu roztworu 10 $\mu\text{g/ml}$ pracę serca u jednego osobnika, wynosiła 78 uderzeń na minutę (rys. 6).

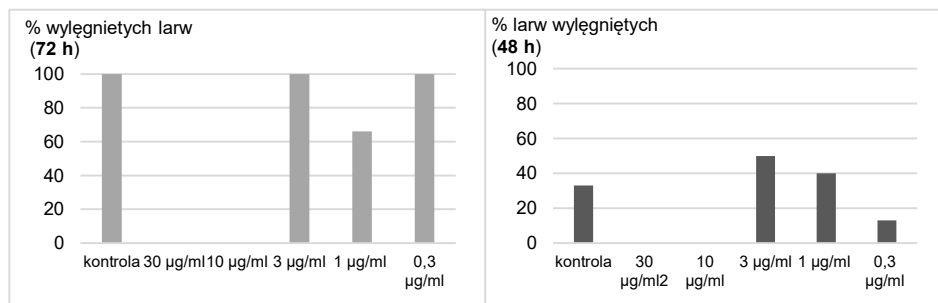


Rys. 1 i 2. Śmiertelność po 24h (A) oraz 48h (B) po podaniu propolisu

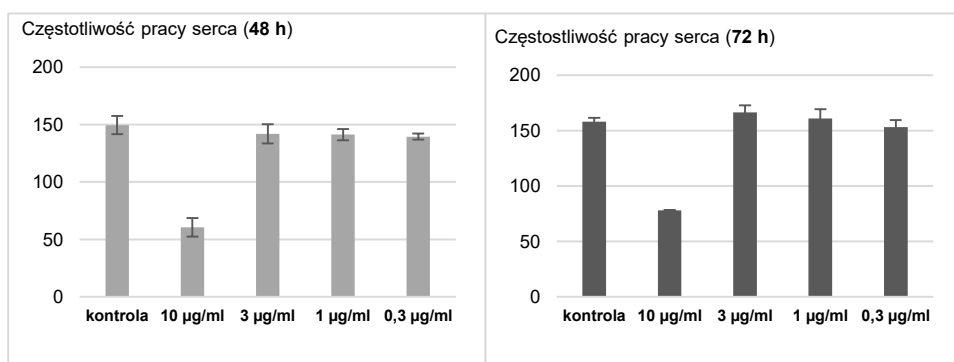
Źródło: opracowanie własne.



Rys. 3. Porównanie embrionu z próby kontrolnej (A) oraz w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$ po 24 h ekspozycji (B)



Rys. 4 i 5. Ilość wylęgniętych larw po 48 h oraz 72 h po zapłodnieniu



Rys. 6 i 7. Częstotliwość uderzeń serca po 48 h oraz 72 h od dodania roztworu propolisu

Wnioski

Śmiertelność embrionów w grupach o stężeniu propolisu ≥ 100 µg/ml wynosiła 100%. Świadczy to o negatywnym działaniu propolisu na rozwój danio przegowanego w tych stężeniach. Propolis w stężeniu 30 µg/ml i 10 µg/ml powodował wyraźnie opóźnienie w rozwoju osobniczym, co może sugerować antyproliferacyjny bądź proapoptotyczny efekt propolisu, skutkowało to też opóźnionym wylęganiem.

Hamujący wpływ na rozwój zarodka jest interesującym aspektem działania propolisu, który zostanie zbadany dokładniej w planowanych następnych badaniach.

Literatura

- Braunbeck D.T., Lammer E., 2006: *Fish Embryo Toxicity Aquatic Ecology & Toxicology*. Department of Zoology University of Heidelberg Im Neuenheimer.
- Popova M., Giannopoulou E., Skalicka-Woźniak K. i inni, 2017: *Characterization and biological evaluation of propolis from Poland*. *Molecules*, 22(7):1159.
- Sokół R., Michalczyk M., 2012: *Choroby owadów użytkowych*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn.

The effect of propolis on the development of zebrafish (*Danio rerio*)

Summary: The research was conducted on 150 zebrafish (*Danio rerio*) embryos. After 24 hours exposition to propolis the mortality of embryos has been estimated. After exposure it was noticed that propolis in concentration ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ causes 100% mortality rate in embryos, concentration 30 $\mu\text{g/ml}$ causes death in 93% embryos and 10 $\mu\text{g/ml}$ leads to death rate 33%. Lower concentrations did not cause deaths in any embryos. What is interesting propolis in concentration 30 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ also caused significant delayed in development which may suggest antiproliferative or proapoptotic effect of propolis. After 48 and 72 hours from propolis exposed embryos heart contraction was measured. It was noticed that in 10 $\mu\text{g/ml}$ propolis solution heart contraction was 42% lower. Those interesting inhibitory properties of propolis are going to be investigated more precisely in planned research.

Keywords: zebrafish, propolis, embryos, death